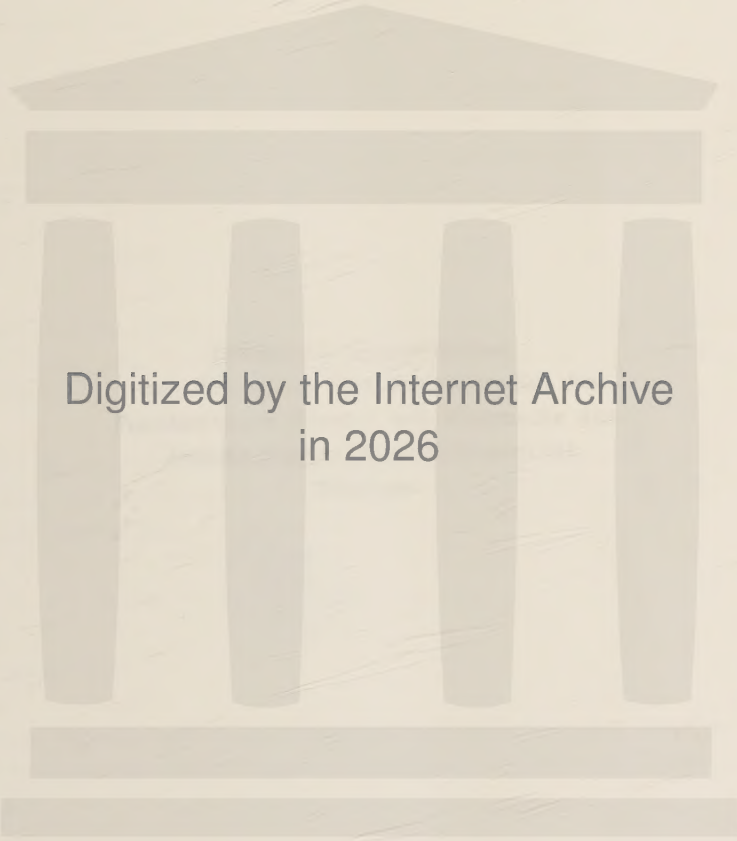


**ZUM MECHANISMUS DER
STABILISIERTEN ENDOZYTOSIS DER
ERYTHROZYTENMEMBRAN DURCH
POLARE AGENTEN WIE VITAMIN A,
PRIMAQUINE UND PROMETHAZIN**

Ulrich Vogel

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0019

ZUM MECHANISMUS DER STABILISIERTEN
ENDOZYTOSE DER ERYTHROZYTENMEMBRAN DURCH POLARE
AGENTIEN WIE VITAMIN A, PRIMAQUINE UND PROMETHAZIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ulrich Vogel
aus
Friedberg/Hess.

München 1978



1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Hannig
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.78

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Hannig durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

danke ich sehr herzlich für das mir entgegengebrachte Wohlwollen und sein Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Kurt Hannig

bin ich für die Ermöglichung und großzügige Förderung dieser Arbeit sowie für die guten Arbeitsbedingungen zu großem Dank verpflichtet.

Für die Einweisung in die Methodik der biochemischen Arbeitsmethoden, die anregenden Diskussionen und die stete Unterstützung danke ich

Herrn Dr. Hans-Georg Heidrich

ganz besonders.

Herzlich möchte ich allen Freunden und Mitarbeitern des Arbeitskreises für Ratschläge und ständige Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Symbolverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines über Aufbau und Funktion von biologischen Membranen unter besonderer Be- rücksichtigung der Erythrozytenmembran	1
1.2. Problemstellung	3
2. Material	4
2.1. Frischblut	4
2.2. Chemikalien	4
2.3. Standard - Puffersysteme	4
3. Biochemische Präparations- und Analysenmethoden	6
3.1. Präparation von Erythrozytenghosts	6
3.1.1. Präparation von "unsealed ghosts"	6
3.1.2. Präparation von "resealed ghosts"	6
3.2. Vesikulierung der ghosts	7
3.2.1. Arten der Vesikulierung	7
3.2.2. Inside-out Vesikulierung	8
3.3. Homogenisation	10
3.4. Elektrophoretische Methoden	10
3.4.1. Trägerfreie Elektrophorese	10
3.4.1.1. Aufladung von Partikeln	10
3.4.1.2. Wanderungsgeschwindigkeit von Partikeln	12
3.4.1.3. Trennung von ghosts und I ⁺ O ₂ ⁻ -Vesikeln in der trägerfreien Elektrophorese	13
3.4.2. SDS-Gelelektrophorese zur Charakterisie- rung von Membranproteinen	14
3.5. Lichtmikroskopische Verfahren zur Beobach- tung morphologischer Veränderungen der Ghost- membran unter verschiedenen Bedingungen	17
3.5.1. Kontrollierbare Vesikulierung	17
3.5.2. Phospholipasezusatz	18

3.5.3.	Dialyse gegen Puffer niedriger Ionenstärke	18
3.5.4.	Dialyse gegen niederionigen Puffer mit Promethazinzusatz	19
3.5.5.	Vesikulieverhalten der geschlossenen ghosts nach Finean	19
3.6.	Dichtegradientenzentrifugation	19
3.6.1.	Permeabilitätsverhalten gegenüber ^{14}C -Saccharose	20
3.6.2.	Darstellung von "resealed ghosts" im isotonischen Milieu	21
3.6.3.	Phospholipidbestimmung der Banden des Dextrankissens	21
3.7.	Quantitative Proteinbestimmung	22
3.8.	Quantitative Bestimmung von Promethazin in den Membranfraktionen	22
3.8.1.	Promethazinbestimmung	22
3.8.2.	Konzentrationsbestimmung von Promethazin in den I.O.- und R.O.-Partikeln, erhalten durch trägerfreie Elektrophorese	24
3.8.3.	Konzentrationsbestimmung in nicht homogenisierten ghosts	24
3.8.4.	Konzentrationsbestimmung in der oberen und unteren Bande des Dextrankissens (3.6.)	25
3.8.4.1.	Konzentrationsbestimmung nach mehrmaligem Waschen	25
3.8.4.2.	Konzentrationsbestimmung nach aufsteigender Dialyse	25
3.8.5.	Sättigungsverhalten der oberen und unteren Bande	26
3.8.6.	Auftrennen der Banden des Dextrankissens in der trägerfreien Elektrophorese	26
3.9.	Bindungsstudien	27
3.9.1.	Beteiligung von hydrophoben Bindungen	27
3.9.2.	Beteiligung von Ionenbindungen	28
3.9.3.	Rangstellung der Ionenbindung	28

3.9.4.	Charakterisierung der Bindung	29
3.10.	Radioaktives Promethazin	30
3.10.1.	Katalytische Tritiierung im Modellversuch	30
3.10.2.	Präparative Reinigung von tritiiertem Promethazin	31
3.10.3.	Reinheitsprüfung	31
3.10.3.1.	Reinheitsprüfung in der trägerfreien Elektrophorese	31
3.10.3.2.	DC-Analyse	32
3.10.4.	Herstellung einer ^3H -Tracer-Lösung	32
3.11.	Lokalisierung des ^3H -Promethazinmoleküls auf der Membranoberfläche	32
3.11.1.	Abtrennung von freiem und gebundenem ^3H -Promethazin	33
3.11.2.	Einbettung für die Elektronenmikroskopie	33
3.11.3.	Schnittherstellung für elektronenmikroskopische Autoradiographie	34
3.11.4.	Befilmung der Silbernetze	34
3.11.5.	Expositionszeit und Entwicklung	35
3.11.6.	Elektronenmikroskopie	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Präparations- und Trennungsmethoden	36
4.1.1.	Stabilität der unsealed ghosts	36
4.1.2.	I.O.-Vesikulierung der ghosts	36
4.1.3.	Beobachtung und Definition einer I.O.-Vesikulierung unter lichtmikroskopischen Aspekten	38
4.1.4.	Homogenisation	42
4.1.5.	Elektrophoretische Trennung von ghosts und I.O.-Vesikeln	42
4.1.6.	Dextrankissen	44
4.1.6.1.	Banden im Dextrankissen	44
4.1.6.2.	Membrancharakterisierung der Banden des Dextrankissens durch SDS-Gelelektrophorese	46
4.1.6.3.	Phospholipidgehalt	47

4.1.6.4.	Verhalten von isoionischen ghosts im Dextrankissen	48
4.1.6.5.	Verhalten von ^{14}C -Saccharose	49
4.2.	Quantitative Aussagen über den Promethazingehalt der Membranen	50
4.2.1.	Quantitative Promethazinbestimmung	50
4.2.2.	Promethazingehalt in R.O.- und I.O.-Partikeln	51
4.2.3.	Promethazingehalte in beiden Banden des Dextrankissens und in beiden Fraktionen der trägerfreien Elektrophorese	53
4.3.	Versuche zur Definition der Promethazinbindung	53
4.3.1.	Einfluß der Ionenkonzentration und des Membranzustandes auf die Endozytose	53
4.3.2.	Stabilisierende Wirkung von Promethazin	55
4.3.3.	Charakterisierung (Überstand und Membranen) nach Dialyse im niederionischen Puffer (in Abwesenheit und Gegenwart von Promethazin)	58
4.3.4.	Sättigungskurve	59
4.3.5.	Scatchard-plot	62
4.4.	Versuche mit radioaktivem Promethazin zur Lokalisierung	63
4.4.1.	DC-Reinigung des tritierten Promethazins	63
4.4.2.	Elektrophoretische Nachreinigung der ^3H -Stamm- lösung zur Darstellung einer Tracerlösung	64
4.4.3.	Elektrophorese ^3H -Promethazin-behandelter Membranfraktionen	66
4.4.4.	Elektronenmikroskopische Autoradiographie	67
5.	Diskussion	68
5.1.	Charakterisierung der Membranpopulationen	68
5.2.	Interaktionen des Promethazinmoleküles mit der Ghostmembran	72
5.3.	Mechanismus	76
6.	Zusammenfassung	82
	Literaturverzeichnis	86
	Lebenslauf	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat
ghost	Nachdem sich das Wort "ghost" in der deutschen Literatur eingeführt hat, wird es in der vorliegenden Arbeit in der englischen Schreibweise verwendet. ghost= leerer Erythrozyt (Blutschatten)
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz (Titriplex III)
HAC	Essigsäure
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Puffersubstanz nach Good)
I.O.	Inside-out
leaky	
(unsealed)	Durchlässige Ghostmembran
MG	Molekulargewicht
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PPO	2,5-Diphenyl-oxazol
resealed	
ghost	Wiedergeschlossene Ghostmembran
R.O.	Rightside-out
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamid
TRA	Triäthanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehung pro Minute

SYMBOLVERZEICHNIS

$\text{\AA}$	Angström
c	Konzentration in Mol/l
E	Extinktion
g	Erdbeschleunigung
M	Molar
N	Normal
n	Brechungsindex
$\bar{u}_e$	Elektrophoretische Beweglichkeit
κ	Leitfähigkeit
ϵ	Dielektrizitätskonstante
η	Viskositätskoeffizient
ζ	Zetapotential
ψ	Oberflächenpotential

1. Einleitung =====

1.1. Allgemeines über Aufbau und Funktion von biologischen Membranen unter besonderer Berücksichtigung der Erythrozytenmembran.

Plasmamembranen von Eukarionten sind keine statischen Gebilde, sondern müssen wegen ihren vielfältigen Funktionen (Permeabilitätsbarrieren, erregbare Strukturen, Sitz hormonbindender Rezeptoren und Enzymsystemen) eine gewisse Fluidität in ihren Bauelementen zeigen, d.h., sie müssen befähigt sein, ihre Bestandteile und deren Wirkungsmechanismen im Membranverband ständig neu zu verteilen. Solche Membranen bestehen in unterschiedlichen Verhältnissen aus Protein, Lipid und Kohlehydrat, wobei der Kohlehydratanteil sowohl an Proteine, als auch an Lipide gebunden ist.

Generell wird eine biologische Membran von einer Lipiddoppelschicht gebildet, bei der die polaren Gruppen der Phospholipide nach Außen gerichtet sind und mit dem hydrophilen Zellinnen- und Zellaußenraum in Kontakt treten können. Die hydrophoben Anteile der palisadenförmig angeordneten Lipide weisen dagegen in das Zentrum der Membran. Ein Teil der Membranproteine, die sogenannten integrierten Proteine, sind unterschiedlich stark mit den Membranlipiden verbunden. Einige von ihnen springen an der Membranaußenseite hervor, andere ragen in das Zellinnere hinein und wieder andere durchziehen die gesamte Membran, wie z.B. das Glycophorin, ein sehr wichtiges und viel untersuchtes Protein der menschlichen Erythrozytenmembran (1). Derjenige Proteinanteil, der mit der wässrigen Umgebung konfrontiert wird, trägt vorwiegend hydrophile Gruppen, während der in die Lipiddoppelschicht versenkte Anteil reich an nicht-polaren Aminosäuren ist (2).

Eine gewisse Assymmetrie der Membranproteine spiegelt sich demzufolge auch in ihren unterschiedlichen Lösungsverhalten wieder. Im Gegensatz zu hydrophoben Proteinen sind periphere Proteine auch ohne Verwendung von Detergentien von der Membran abzutrennen, da sie dieser nur locker aufliegen. Singer (3) vertritt die Ansicht, daß sie an die hydrophilen Molekülbereiche integrierter Proteine gebunden sind. Einige dieser peripheren Proteine der Membranaußenseite sollen in der Lage sein, gelöste Substanzen zu binden, um sie durch die Membran zu transportieren, oder als Rezeptoren zu fungieren. Die peripheren Proteine der Membraninnenseite haben dagegen actomyosin ähnlichen Charakter (Spektrin) und werden für Membrandeformationen verantwortlich gemacht. Sie sollen darüber hinaus der zellulären Beweglichkeit, der Transportfunktion und der Adhäsion dienen (4).

Zum umfassenden Verständnis der Membranfunktion ist es notwendig, gerade von der Membraninnenseite weitere Kenntnisse zu erwerben, die aber wegen der Unzugänglichkeit der Isolierungstechniken bisher größtenteils auf Spekulationen beruhten. Neuere Studien von Heidrich und Leutner (5, 6, 7) zeigen, daß durch polare Agentien, wie Vitamin A, Primaquine oder Promethazin Membraneinstülpungen nach Innen erzeugt werden können und die so entstandenen Vesikel die ursprüngliche Innenseite nach Außen kehren. Da sich die Dichten beider Membranpopulationen aber nicht unterscheiden (und daher nicht durch die klassische Dichtezentrifugation getrennt werden können), gelang es nur durch trägerfreie Elektrophorese diese I.O.-Vesikel auf Grund ihrer relativ großen negativen Überschlußladung von den Partikeln, die ihre Außenseite nicht umorientiert haben (outside-out Partikel) abzutrennen. Enzymatische Untersuchungen zeigten, daß diese Vesikelpopulation homogen abgetrennt werden konnte und somit den Weg für weitere Versuche zum Verständnis des Mechanismus der Membranfunktion öffnen kann.

1.2. Problemstellung

Der Mechanismus der Membraneinstülpung ist in der Natur ein weit verbreiteter Prozeß und wurde lichtmikroskopisch schon sehr früh bei Leukocyten, Makrophagen, Epithelzellen und Oocyten beobachtet. Diese einfache Funktion kann Bestandteil sowohl für immunologische Abwehrreaktionen und makromolekulare Transportaufgaben sein, als auch zur metabolischen Regulation oder bloßen Nahrungsaufnahme dienen.

Die Bedeutung der Endozytose für die Erythrozytenmembran kann zum einen darin gesehen werden, Moleküle in das Zellinnere aufzunehmen, ohne daß sie die Zellmembran permeieren müssen - zum anderen könnten durch Verlagerungen in der Zellmembran, die eingeschleusten Substanzen selektiv und lokal angereichert und in höheren Konzentrationen aufgenommen werden. Das Flüssigkeits-Mosaik-Modell gibt durch die laterale Beweglichkeit der Proteinmoleküle im fluiden Lipidfilm eine anschauliche Erklärung für eine derartige Anreicherung der Rezeptormoleküle im einzustülpenden Membranbereich.

Nachdem auch in vivo morphologische Membranveränderungen mittels Vitamin A beobachtet wurden, sollte es das Ziel der vorliegenden Arbeit sein, zu klären, ob sich erwähnte oder vergleichbare Substanzen an die Membranoberfläche binden oder/und diese nur konformativ verändern. Gleichzeitig sollte die Möglichkeit einer stabilisierenden Wirkung dieser Moleküle auf die Membran untersucht werden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse könnte eine endgültige These über Energie-gesteuerte oder Energie-unabhängige Endozytose möglich sein.

Bei der Durchführung dieser Arbeit waren möglichst viele biochemische Techniken zu erlernen und anzuwenden.

2. Material =====

2.1. Frischblut

Es wurde frisches Humanblut der Gruppe O⁺ von der Blutbank Dr. Rasch, Lessingstraße 6, 8 München, verwendet. Jeweils 50 ml Frischblut waren mit ca. 10 ml ACD-Stabilisator versetzt.

2.2. Chemikalien

Organische und anorganische Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Firma Merck, Darmstadt, in analysenreiner Qualität bezogen. Promethazin-HCl war ein Geschenk der Firma Dolder Basel/Schweiz. ³H-Promethazin-HCl, katalytisch tritiert, wurde in ungereinigter Form von Firma Buchler, Amersham, England bezogen. ¹⁴C-Saccharose lieferte die Firma NEN, Boston, Mass. USA. Dextran stammte von Firma Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala Schweden. Phospholipase C (cl. welchii) wurde bei Firma Sigma, Neubiberg b. München, die Phospholipidbestimmung bei Firma Boehringer & Soehne, Mannheim bestellt.

2.3. Standard - Puffersysteme

Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

Isotonischer Erythrozytenpuffer (PBS-Puffer): 0,005 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 8,0 + 0,15 M NaCl. Elektr. Leitfähigkeit: $\alpha = 1,5 \times 10^4$ p
Osmolarität: 270 mOsm.

Hypotonischer Hämolysepuffer: 0,005 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer
pH 7,6, Leitfähigkeit $\alpha = 7 \text{ mI} \times 10^2$ μS , Osmolarität: 20 mOsm.

Elektrophoresepuffer (Trennpuffer, Kammerpuffer, TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer): 10 mM TRA, 10 mM HAC, 0,1 mM MgSO₄, pH 7,4 mit NaOH (2N).
Leitfähigkeit: $\alpha = 6,7 \times 10^2$ μS , Osmolarität: 27 mOsm.

Elektrodenpuffer für trägerfreie Elektrophorese:

100 mM TRA, 100 mM HAC, pH 7,4 mit NaOH (2N),

Leitfähigkeit: $\alpha = 5,5 \times 10^3 \cdot \mu\text{S}$

Dialysepuffer:

0,2 mM EDTA, pH 7,5 mit NaOH (0,1N) Leitfähigkeit: $\alpha = 0,6 \times 10^2 \mu\text{S}$

Osmolarität: 5 mOsm.

ACD-Stabilisator: Trinatriumcitrat $\times 2\text{H}_2\text{O}$, 13,2 g; Citronensäure, 4,4 g; Saccharum amylac. $\times \text{H}_2\text{O}$, 14,7 g; ad 1000 ml bidest. H_2O .

3. Biochemische Präparations- und Analysenmethoden =====

3.1. Präparation von Erythrozytenghosts

3.1.1. Präparation von "unsealed ghosts"

50 ml Frischblut der Blutgruppe O⁺ wurden auf 4 eisgekühlte Polypropylenröhrchen gleichmäßig verteilt und mit ca. 35 ml PBS-Puffer, pH 8,0, bis zur Markierung aufgefüllt. Anschließend wurde in einer Sorvallzentrifuge, Rotor SS 34, bei 1 000 Upm (= 121 xg) 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Erythrozytenpellets mußten unter vorsichtigem Aufsuspendieren solange mit PBS-Puffer gewaschen werden, bis der Überstand klar war. Die Rückstände wurden vereinigt (ca. 30 ml) und 20 Minuten in ca. 500 ml 0,005 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 7,6, unter langsamen Rühren bei 0°-4°C hämolysiert (8). Das Hämolysat wurde sodann auf 4 Sorvall GSA-Becher verteilt und bei 11500 Upm (21500 xg) 15 Minuten zentrifugiert. Der hämoglobinhaltige Überstand wurde verworfen. Die noch rötlichen Rückstände wirbelte man vorsichtig mit hypotonischem Phosphatpuffer auf, verteilte sie auf 6-8 eisgekühlte Corex 30 ml-Glasröhrchen und zentrifugierte 10 Minuten bei 20200 xg, 4°C. Dieser Schritt wird solange wiederholt, bis das Ghostpellet nahezu weiß ist ("ghost" = Blutschatten). In einem graduierten Gefäß wird anschließend das Volumen der Ghostsuspension bestimmt (Standardsuspension). Da die Membranen dieser ghosts, bedingt durch das hypotonische Milieu noch durchlässig ("leaky") sind, spricht man von "unsealed ghosts".

3.1.2. Präparation von "resealed ghosts"

Vesikel, deren Membranen noch nicht wieder geschlossen (resealed) sind, können für spezifische Bindungsstudien oder Transportvorgänge nicht verwendet werden, da zugesetzte Moleküle ungehindert eindringen und unkontrolliert mit der Innenseite der Membran reagieren können. Aussagekräftig können Versuche

nur dann sein, wenn "Einsiegelungen" der Moleküle, wie z.B. Substrate, in das Vesikel vermieden werden.

Das Schließen der Membran, das verbunden ist mit der Herstellung ihrer semipermeablen Eigenschaft, kann z.B. durch Temperaturanwendung erreicht werden. (5, 9,10): Die bei 0°C hämolysierte Ghostsuspension wird bei pH 7,6 und 37°C eine Stunde im Wasserbad inkubiert, wobei sich die Zellmembranen wieder schließen.

Isoionische Bedingungen zum Schließen der Membran wendet die Arbeitsgruppe von Finean (11) an. Hierzu wurden die Erythrozyten im isoionischen Hepes-Puffer, pH 7,4, 3 Mal gewaschen; die Hämolysen aber im Gegensatz zu 3.1. im isoionischen Glycerinpuffer, pH 7, 4, bei 20°C durchgeführt. Nach anschließender Behandlung (4-5 Mal) im isoionischen Hepespuffer, pH 7,4, ohne Glycerin bei 0°C waren die Ghostmembranen nahezu weiß. Um diese ghosts u.a. den üblichen hypotonen Bedingungen anzupassen, wurden sie 2 Mal mit $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,005 M) pH 7,6, gewaschen.

3.2. Vesikulierung der ghosts

3.2.1. Arten der Vesikulierung

Es gibt zwei Möglichkeiten der Membranvesikulierung:

- 1) Vesikulierung nach Außen (Exozytose) mit einer Mischung von 3,4 mg Inosin-5'-triphosphat (6 mM-ITP); 0,25 mg Hexokinase und 2,0 mg D (+) -Glucose (10 mM) pro ml 0,005 M hypotonischer Phosphatpufferlösung pH 8,0 (12). Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten bei 37°C beobachtet man zahlreiche Abschnürungen nach Außen, wobei die ursprünglich nach Außen gerichtete Seite der Membran wieder Außen ist (right side out = R.O.).

- 2) Vesikulierung nach Innen (Endozytose) kann z.B. durch lipophile Reagentien mit polaren Endgruppen ausgelöst werden. Man kann im Phasenkontrastmikroskop (3.5.) den Beginn der Membraneinstülpung bis hin zur Abschnürung der Vesikel nach Innen verfolgen. Die gebildeten Vesikel können durch verschiedene Homogenisationsmethoden (3.3) freigesetzt werden, wobei dann die Innenseite der Membran nach Außen gerichtet ist (inside-out = I.O.).

Da es Aufgabe dieser Arbeit war, näher auf den Mechanismus der Endozytose einzugehen, wurden weitreichende Versuche über R.O.-Vesikulierung nicht durchgeführt, sondern ausschließlich mit I.O.-partikeln gearbeitet.

3.2.2. Inside-out-Vesikulierung

Wie erwähnt, lassen sich I.O.-Vesikel u.a. durch polare Agentien wie Vitamin A (13,14), Primaquine-Diphosphat (15), Promethazin-HCl (16), Prochlorperazin-Dimaleat (16) herstellen. Wegen der relativ schlechten Wasserlöslichkeit von Vitamin A wurde auf das Vitamin A - Trockenpulver (1 g = 300 000 i.E.) der Firma Merck, Darmstadt, zurückgegriffen und je 1 ml Ghoststandardsuspension mit 1 mg Vitamin A inkubiert (37°C, 60 Minuten). Der Verlauf der I.O.-Vesikulierung läßt sich im Phasenkontrastmikroskop ebenso gut verfolgen, wenn anstelle von Vitamin A mit Promethazin-HCl inkubiert wird. Hierzu wird Promethazin-HCl im hypotonischen Phosphatpuffer, pH 7,6, gelöst ($10^{-3}M$) und mit der Ghostsuspension im Verhältnis 1:1 versetzt. Nach 45 - 60 Minuten war bei 37°C die Einstülpung der Membran nach Innen beendet, wobei die Membranen gleichzeitig geschlossen ("sealed membrane") wurden. Um überschüssiges Reagenz zu entfernen, wurden die so behandelten ghosts noch mit 0,005 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH 7,6, gewaschen und bei 37 000 xg 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

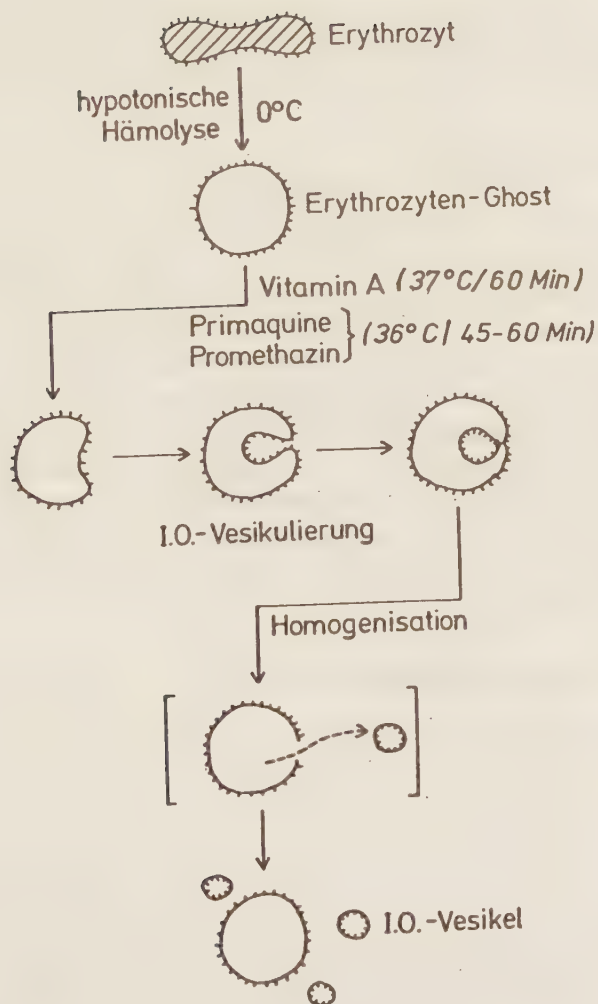


Abb. 1 zeigt schematisch den Aufarbeitungsgang zur Darstellung von I.O.-Vesikeln.

Eine Abtrennung der gebildeten I.O.-Vesikel aus den umhüllenden Membranen kann durch Homogenisation erfolgen (siehe Abbildung 1 und 3.3.).

3.3. Homogenisation

Die nach 3.2.2. hergestellten I.O.-Vesikel sind noch in den ghosts eingeschlossen, müssen aber für weitere Versuche frei und abgetrennt vorliegen. Dies wird erreicht, indem die mit Promethazin-HCl behandelten und einmal mit hypotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6, gewaschenen und zentrifugierten Ghostmembranen wieder in wenig Phosphatpuffer aufgenommen und langsam durch eine 27 gauge-hypodermic Nadel (8) in das doppelte Volumen TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, gepreßt werden. Dieser Schritt wird im Phasenkontrastmikroskop verfolgt und je nach Effektivität noch 1 - 2 Mal wiederholt. Anschließend wird mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer aufgefüllt und bei 37 000 xg 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

3.4. Elektrophoretische Methoden

3.4.1. Trägerfreie Elektrophorese

3.4.1.1. Aufladung von Partikeln

Unter Elektrophorese versteht man allgemein die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld mit konstanter Geschwindigkeit durch ein meistens viskoses Medium (Elektrolyten). Bei der trägerfreien Elektrophorese fließt senkrecht zum elektrischen Feld ein laminarer Pufferstrom, in dem Teilchen auf Grund unterschiedlicher Nettoladungen verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten erhalten und somit durch Abweichungen ihrer Migrationswege örtlich voneinander getrennt werden (Abb.2).

Diese Tatsache trifft für niedermolekulare Substanzen ebenso

zu, wie für hochmolekulare Stoffe und grobdisperse Teilchen (17). Verantwortlich für die Oberflächenladung von Partikeln (Proteinmolekülen, Membranen, Zellen) ist der pH-Wert, die Konzentration und die Art des Puffers.

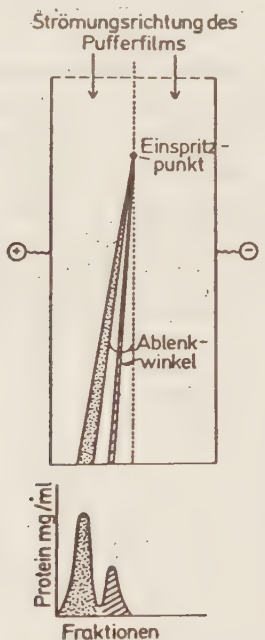


Abb. 2 Schema einer elektrophoretischen Trennung

Die entgegengesetzt geladenen Pufferionen lagern sich proportional ihrer Teilchenladung an die Partikeloberfläche derart an, daß diese durch Anionen (wegen ihrer relativ kleinen Ionenradien) stärker negativ polarisiert wird, als durch die voluminöseren, stark hydratisierten Kationen. Hinzu kommt, daß gerade Oberflächen biologischer Herkunft im wässrigen Milieu die Tendenz zeigen, sich negativ aufzuladen.

3.4.1.2. Wanderungsgeschwindigkeit von Partikeln

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Oberflächenladung des Teilchens und seinem Reibungswiderstand im jeweiligen Medium.

In salzhaltiger Lösung umgeben sich suspendierte Partikel mit einer elektrischen Doppelschicht. Diese ist abhängig von der Ionenstärke des jeweiligen Puffers. Die Doppelschicht besteht aus zwei gegeneinander abgesetzten Konzentrationsbereichen, einem inneren, der sogenannte Stern- oder Helmholtzschicht, in der Pufferionen in hoher Ladungsdichte fest adsorbiert sind, und einem äußeren, der als Gouy-Chapman-Schicht oder Debye-Hückel'sche Ionenwolke bezeichnet wird (Abb. 3).

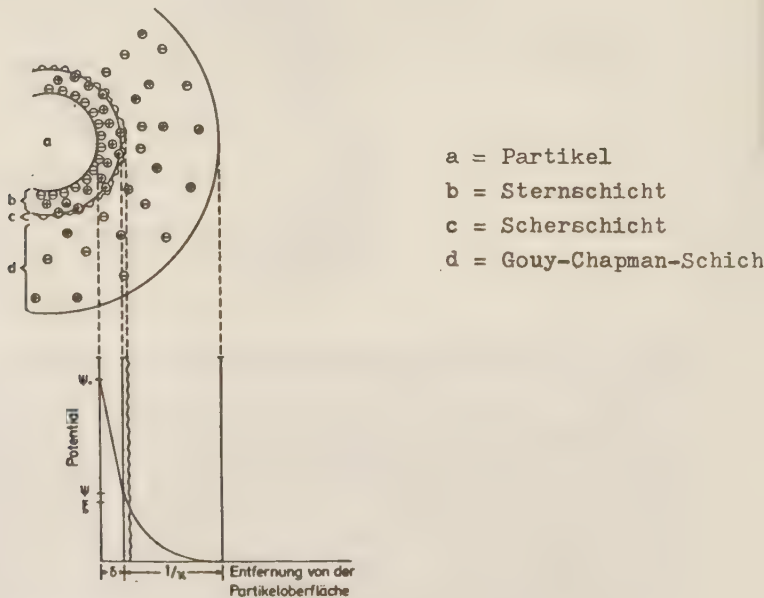


Abb. 3 Schematische Darstellung eines geladenen Partikels mit der ihn umgebenden elektrischen Doppelschicht und der auftretenden Potentiale.

Letztere ist im Gegensatz zur Sternschicht aus einer diffusen Ionenwolke aufgebaut. Zwischen beiden Bereichen liegt die sogenannte Scherschicht oder Scherfläche. Abbildung 3 zeigt, daß mit zunehmender Entfernung von der geladenen Partikeloberfläche die Konzentration der Gegenionen exponentiell abnimmt. Entsprechend nimmt das Oberflächenpotential ψ_0 des Partikels bis auf ψ_s in der Sternschicht ab und fällt bis zur Scherschicht auf das ζ -(zeta)-Potential, bis es sich in der diffusen Ionenwolke dem Wert Null nähert. Elektrokinetische Messungen können nur von der diffusen Ionenwolke her abgeleitet werden, da die dem Partikel fest anhaftende Sternschicht, die eigentlich die Oberflächenladung bestimmt, Messungen nicht zugänglich ist. Die Beweglichkeit wird also ausschließlich durch die Ladungsdichte an der Scherschicht und das ζ -Potential bestimmt. Sie lautet nach Smoluchowski:

$$\bar{u}_e = \frac{\epsilon \zeta H}{4 \pi \eta}$$

$\bar{u}_e$ = elektrophoretische Beweglichkeit
 im elektrischen Feld
 ϵ = Dielektrizitätskonstante ($H_2O = 80$)
 ζ = zeta-Potential
 η = Viskositätskoeffizient
 H = Feldstärke

Die Gleichung gilt für Teilchen mit großer Ionenwolke, wenn kein Relaxationseffekt auftritt und für Puffer mit höherer Ionenstärke ($>10^{-3}M$).

Sind diese Bedingungen erfüllt, wie z.B. bei den ghosts, I.O. und R.O.-Partikeln und den verwendeten Puffersystemen, so ist die Ablenkung nicht von der Partikelgröße, sondern nur von der Ladung abhängig.

3.4.1.3. Trennung von ghosts und I.O.-Vesikeln in der trägerfreien Elektrophorese.

Für alle Versuche wurde die trägerfreie, kontinuierliche Ab-

lenkungselektrophorese nach Hannig (6, 17) verwendet. Die Abbildung 2 gibt schematisch das Trennprofil eines Gemisches aus R.O.-Partikeln (ghosts) und I.O.-Vesikeln wieder. Hierbei bezeichnet die punktierte Fläche die sehr weit abgelenkten ghosts oder R.O.-Partikel, während die schraffierte Fläche die I.O.-Vesikel, bezogen auf den Proteingehalt, wiedergibt.

Trennbedingungen:

Gerät:	Elphor VAP 5
Kammer:	Länge 493 mm Breite 100 mm Kammerspalt 0,4 mm
Kammerpuffer:	10 mM TRA-HAC, 0,1 mM MgSO_4 , pH 7,4 mit NaOH (2N)
Elektrodenpuffer:	100 mM TRA-HAC, pH 7,4, mit NaOH (2N)
Strom:	95 mA
Spannung:	1000V
Temperatur:	5°C
92-fach Pumpe:	2,6 ml/Fraktion/Std.
Dosierpumpe:	2,2 ml/Std.

3.4.2. SDS-Gelelektrophorese zur Charakterisierung von Membranproteinen.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (18) wurde nach der abgewandelten Methode von Laemmli (19) durchgeführt. Zur Elektrophorese wurde eine selbstgebaute Apparatur aus Plexiglas verwendet. Sie bestand aus einem kühlbaren Untergefäß (1500 ccm) und einem Aufsatz (700 ccm) zur Aufnahme von insgesamt 10 ca. 11 cm langen Glasröhrchen (5 mm Durchmesser).

Lösung a) 30 g Acrylamid, 0,8 g N,N' Methylenbis-acrylamid (Bis) mit bidest. Wasser ad 100 ml

Lösung b) 400 mg SDS (Natriumdodecylsulfat), 18,15 g Tris (0,375 M), 0,1 ml TMED mit HCl auf pH 8,8 einstellen und mit bidest. Wasser ad 200 ml.

Lösung c) 2,1 g Ammoniumperoxidisulfat ad 100 ml bidest. Wasser.

Das 7,5% Trenngel wurde wie folgt hergestellt:

7,5 ml Lösung a, 15 ml Lösung b, 6,5 ml bidest. Wasser werden gut gemischt und entgast (Wasserstrahlpumpe). Der entgasten Gellösung gibt man sodann 1 ml Lösung c hinzu, rührt vorsichtig und füllt die Glasröhrchen damit bis zu einer Höhe von 9 cm auf. Um den Meniskus zu begradigen, wird mit bidest. Wasser vorsichtig überschichtet (5 - 7 Tropfen) und zusätzlich unter einer UV-Lampe polymerisiert. Nach ca. 15 Minuten wird das überschichtete Wasser abgesaugt und jedes Gelstäbchen mit 1 - 2 Tropfen Elektrodenpuffer (1:4 verdünnt) versetzt. Die Glasröhrchen werden in das mit Elektrodenpuffer gefüllte und auf 15°C gekühlte Untergefäß eingesetzt, und die aufgeschlossenen Proben durch vorsichtiges Unterschichten des Elektrodenpuffers auf das Trenngel aufgetragen. Auf ein Sammelgel (Upper-Gel) wurde verzichtet. Der Aufschlußpuffer für die Proben hatte folgende Zusammensetzung:

2 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0, wurden mit 4 ml bidest. Wasser verdünnt; zu 5 ml dieser Lösung gab man 0,1 g SDS, 0,25 ml Mercaptoäthanol und 0,5 ml Glycerin.

Die Proben (50 µg Protein in 30 - 50 µl Aufschlußpuffer) werden 20 Minuten bei 70°C aufgeschlossen. Die Lösung muß, bevor sie mit 30 psi in der Beckman Air-fuge 10 Minuten lang zentrifugiert wird, vollkommen klar sein. Ansonsten muß erneut

mit Aufschlußpuffer behandelt werden.

Durch SDS-Überschuß wird die Membranarchitektur so massiv zerstört, daß eine vollständige Trennung von Membranproteinen und -lipiden in Protein- bzw. Peptid-Detergenskomplexe erreicht wird. Im elektrischen Feld werden diese Komplexe anschließend in Abhängigkeit ihrer Größe getrennt, da die entstandenen Proteine wahrscheinlich nur noch die Ladung des Detergens (SDS) tragen (20,21).

Elektrophoresebedingungen:

Elektrodenpuffer: 12,1 g Tris, 57,5 g Glycin, 4,0 g SDS wurden mit HCl auf pH 8,3 eingestellt und ad 1000 ml aufgefüllt (Stammlösung). Für Elektrophoreselauf 1:4 verdünnt.

Auftragsmenge: 80 - 120 µg Protein in 50 - 150 µl Aufschlußpuffer.

Laufrichtung: $\ominus \rightarrow \oplus$

Strom: Vorelektrophorese bei 4 mA/Stäbchen
ca. 1,5 - 2 Stunden.

Hauptelektrophorese bei 3 mA/Stäbchen

Laufzeit: ca. 4 - 5 Stunden bei 15°C.

Das Ende der Elektrophorese zeigte ein sogenannter Farbmarker (Bromphenolblau) an, der bei jedem Lauf auf jeweils 1 Stäbchen aufgetragen wurde.

Die aus den Glasröhrchen herausgelösten Polyacrylamidgelstäbchen wurden anschließend mit der Färbemethode nach Fairbanks (22) behandelt:

Lösung 1: 25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0,025 - 0,05% Coomassie blue R 250, über Nacht.

Lösung 2: 10% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0,0025 - 0,005% Coomassie blue R 250, 9 - 12 Stunden.

Lösung 3: 10% Essigsäure, 0,0025% oder weniger Coomassie blue R 250, über Nacht.

Lösung 4: 10% Essigsäure bis background entfärbt ist.

Alle 4 Färbestufen wurden in Reagensgläsern, die sich auf einer elektrisch betriebenen Wippe befanden, durchgeführt.

Zum Nachweis der identischen Membranstruktur beider Banden des Dextrankissens (3.6.) bzw. zur Darstellung des Membranverhaltens gegenüber Puffern niedriger Ionenstärke ohne (3.5.1.3.) und mit Promethazinzusatz (3.5.1.4.), wurden die Proben nach obiger Methode aufgeschlossen und einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen.

3.5. Lichtmikroskopische Verfahren zur Beobachtung morphologischer Veränderungen der Ghostmembran unter verschiedenen Bedingungen.

Alle Versuchsdurchführungen mit Ghostmembranen wurden grundsätzlich nach morphologischen Gesichtspunkten im Mikroskop beobachtet und beurteilt. Auf Grund der schwachen Brechzahl Differenz zwischen Puffermilieu und Ghostsuspension wurde ein Photomikroskop (Zeiss) mit Phasenkontrast verwendet. Es wurde bei sich stark bewegenden Objekten mit Blitzlampe (60 Wsec), bei ruhenden Präparaten mit einer Stufenautomatik photographiert.

Objektiv: Neofluar 63/1, 25 - 2,0 mit Ölimmersion

Okular: 8

Projektiv: 3,2

Film: Ilford FP 4 (22 DIN) und Ilford PAN F (18 DIN)

Entwickler: Dokumol 1:9, 5 Minuten entwickeln.

3.5.1. Kontrollierbare Vesikulierung

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie sollte kontrolliert werden, inwieweit eine I.O.-Vesikulierung als gelungen und reproduzierbar bezeichnet werden kann. Eine solche schnelle Methode ist

für die Routine brauchbarer, als z.B. das Austesten von enzymatischen Veränderungen auf der Membranoberfläche, wie z.B. Verlust der Acetylcholinesterase (23). Da eine einwandfreie Vesikulierung die Grundlage und Voraussetzung für jeden Versuch war, wurde die Lichtmikroskopie regelmäßig, auch zwischen Präparationsstufen zur Verfolgung eines einwandfreien Versuches ablaufes eingesetzt. Versuche, bei denen lichtmikroskopisch festgestellt wurde, daß irgendeine Stufe oder Reaktion abnormal aussahen, wurden abgebrochen. Neben den Testansätzen wurden stets Blindwerte mikroskopiert. Die Ansätze für die Vesikulierung sind unter 3.2. beschrieben.

3.5.2. Phospholipasezusatz

Es wurde die Frage gestellt, ob durch enzymatische Eingriffe in das Lipidmuster einer Membran optisch feststellbare Formänderungen, ähnlich einer Endozytose eintreten. Eine Änderung der Membranarchitektur wäre denkbar, nachdem durch Zusatz von Phospholipase C Hämolyse erzeugt werden konnte (24).

Zu 1 ml Ghostsuspension wurden 200 µl Phospholipase C (1,5 mg auf 5 ml 0,01 N Tris-HCl, 6,66 mM CaCl₂, pH 7,0) hinzugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert (25). Parallel dazu wurde ein Ansatz mit 10⁻³M Promethazin Lösung (1:1) versehen, und beide Versuchsabläufe im Phasenkontrastmikroskop verfolgt.

3.5.3. Dialyse gegen Puffer niedriger Ionenstärke

Als Grund für eine Membranverformung mußte auch die Frage eines möglichen Spektrinabbaues in Betracht gezogen werden (26). Nach der Methode von Ralston (27, 28), wurden 2 ml Ghoststandard suspension mit 2 ml 0,2 mM EDTA pH 7,5 (NaOH, 0,01N) versetzt und 24 Stunden lang bei 0°C gegen 0,2 mM EDTA dialysiert (Cellophanschlauch 8 mm, Union Carbide, vorher ausgekocht). Man zentrifugierte darnach 20 Minuten lang bei (37 000 xg bei 4°C, nahm den Überstand vorsichtig ab und wiederholte die Dialyse des Rückstandes noch zweimal. Der Überstand wurde in einer Vir-

tis Gefriertrockenapparatur eingeengt und ebenso wie das Dialysat einer Charakterisierung in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen (3.4.2.).

3.5.4. Dialyse gegen niederionigen Puffer mit Promethazinzusatz

Analog zu 3.5.1.3. wurden 2 ml Ghoststandardsuspension mit 0,2 mM EDTA und 10^{-3} M Promethazin-HCl, pH 7,5, behandelt und unter gleichen Bedingungen wie oben dialysiert. Es sollten mit diesem Versuch beschriebene Stabilisierungseigenschaften polarer Drogen (29,30,31) auf die Erythrozytenmembran untersucht werden. Dazu wurde der Überstand ebenfalls gefriergetrocknet und zusammen mit dem Dialysat in einer SDS-Gelelektrophorese analysiert.

3.5.5. Vesikulierverhalten der geschlossenen ghosts nach Finean

Mit beiden Ghostpopulationen - originale und angepaßte ghosts nach Finean 3.1.2. - wurden Vesikulierversuche unternommen, und zwar um zu prüfen, ob unter den gegebenen Milieubedingungen eine Vesikulierung eintrat. Zu diesem Zweck wurden je 1 ml Ghostsuspension mit 1 ml Promethazin - HCl (10^{-3} M) in isoionischem Hepespuffer pH 7,4, bzw. hypotonischem Phosphatpuffer pH 7,6, bei 37°C inkubiert und die Vesikulierschritte im Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Als Vergleich dienten die üblichen Vesikulierungsbedingungen nach 3.2.1. im hypotonischen und isotonischen Phosphatpuffermilieu.

3.6. Dichtegradientenzentrifugation

Um "resealed ghosts", I.O.-Vesikel oder R.O.-Partikel von "unsealed" Membranen zu trennen, ist eine Dichtekissenzentrifugation notwendig (8, 9). Hierzu löste man 3,14 g Dextran T 110 in 100 ml TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, ($n = 1,335$) und pipet-

tierte 7 ml dieser Lösung langsam auf 3 ml einer sich bereits im SW 40 Tube befindlichen 15%igen Dextranlösung ($n = 1,359$). Diese dichte Dextranlösung (15%) sollte einfach verhindern, daß die durch die 3,14%ige Lösung hindurch zentrifugierten Membranen sich als schwer resuspendierbares Sediment auf den Boden des Zentrifugierröhrchens packten. Es ist für biologische Membranen schonender, wenn sie stets in Suspension bleiben. Die durch die 3,14%ige Dextranlösung hindurch zentrifugierten Partikel lagen also als Suspensionsschicht auf der 15%igen Dextranlösung.

Nachdem die Zellsuspension scharf auf dem Stufenkissen aufgetragen war, zentrifugierte man in einer IEC- oder - Beckman 60 Zentrifuge, SW 40 Rotor, 60 Minuten mit 28 000 Upm (100 000 xg) bei 4°C. Dadurch kam es zu einer scharfen Auftrennung in eine obere Bande, die "resealed" Membranen enthielt und eine untere Bande, in der "unsealed" Membranen zu finden waren (5).

3.6.1. Permeabilitätsverhalten gegenüber ^{14}C -Saccharose

Um beweisen zu können, daß die Auftrennung im Dextranskissen tatsächlich nach den beschriebenen Kriterien "leaky" (offen) und "resealed" (geschlossen) geschieht, müssen Substanzen für die weder Carriersysteme, noch feste Bindungen mit Erythrozytenmembranen existieren, unterschiedliches Verhalten gegenüber beiden Banden zeigen.

Zu diesem Zweck wurde der Inkubationssuspension (ghost/Promethazin, 1:1) vor dem "resealing" bei 37°C noch 20 μl ^{14}C -Saccharose (= 5 μCi) zugegeben. Nach 30 Minuten auf dem Wasserbad durch eine 27 gauge-Nadel in ca. das doppelte Volumen TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, homogenisiert und bei 37 000 xg 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Eine Auftrennung in zwei Banden erreichte man durch eine Dichtegradientenzentrifugation, wie unter 3.6. beschrieben, nachdem das Sediment von der Zentrifugation aufsuspendiert war.

Beide Banden wurden vorsichtig abgehebert und mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, dem zur quantitativen Entfernung der überschüssigen, adsorbierten ¹⁴C-Aktivität 5 mM Saccharose zugesetzt wurde (32), gewaschen durch Zentrifugieren. Man bestimmte von 5 Waschschritten die ¹⁴C-Saccharose Aktivität in Überstand und Rückstand. Als Meßgerät diente ein Tri-Carb-Flüssigszintillationszähler der Firma Packard Instruments. Die Proben wurden, wenn notwendig, in Soluene 100 als Emulgator gelöst und in jeweils 5 ml Insta-Gel gezählt.

3.6.2. Darstellung von "resealed ghosts" im isoionischen Milieu

Eine weitere Bestätigung, daß eine Auftrennung der Ghostmembranen im Dextrankissen in geschlossene und offene (leaky) Partikel erfolgt, sollte die Ghostpräparation im isoionischen Milieu nach Finean (11,33) erbringen, welche geschlossen ("sealed") sind.

Alle drei Ghostpopulationen, 1.) originale Finean-ghosts, 2.) hypoton behandelte Finean-ghosts, sowie die 3.) nach 3.1.1. hergestellten ghosts in Phosphatpuffer, wurden stets durch Dichtegradientenzentrifugation unter gleichen Bedingungen charakterisiert.

3.6.3. Phospholipidbestimmung der Banden des Dextrankissens

Bei einer Auftrennung in zwei Banden ist die Methode der Dichtekissenzentrifugation nur dann aussagekräftig und eindeutig, wenn keine gravierenden Unterschiede im Lipidgehalt (und im Proteingehalt) der getrennten Partikel festzustellen sind. Zur Gesamtphosphor- und Phospholipidbestimmung wurde der Boehringer Test Nr. 15620 eingesetzt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 405 nm gegen einen Blindwert. Um freies Phosphat ausschließen zu können, wurde die Ghostdarstellung in einem Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, gewählt (10).

3.7. Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mit der Ninhydrinmethode nach Totalhydrolyse mit 2,5 M NaOH bei 98°C (34) in einem Technicon-AutoAnalyzer (Abb. 4), mit dem die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben bei 570 nm ermittelt wurden.

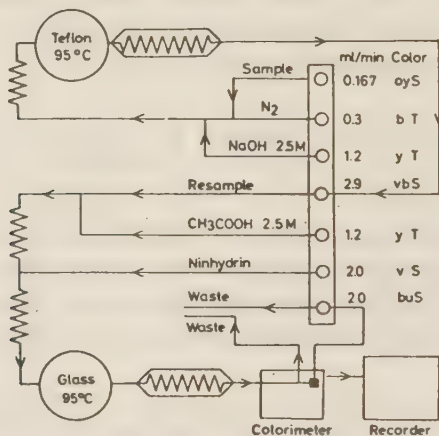


Abb.4: Schematischer Aufbau des Technicon AutoAnalyzers zur Proteinbestimmung

3.8. Quantitative Bestimmungen von Promethazin in den Membranfraktionen

3.8.1. Promethazinbestimmung

Um zu ermitteln, ob die für Endozytose verantwortlichen Moleküle an die Ghostmembran absorbiert oder gebunden werden und welcher Art gegebenenfalls diese Bindung war, mußte neben auto-

radiographischen Methoden (3.11.) ein Nachweisverfahren gefunden werden, das kleinste Mengen ($0,5 \mu\text{g}$) Promethazin-HCl zuverlässig nachweist. Für diesen Fall wurde die Testmethode nach Krieglstein (35) herangezogen und, nachdem sie sich als nicht ausreichend herausgestellt hatte, entsprechend modifiziert.

1 ml einer mit Promethazin behandelten Probe wurde mit 1 ml 4 M Harnstoff, gelöst in NaOH (1 N), versetzt (Bildung der freien Base). Aus dieser Suspension schüttelt man die Base 2 Mal mit je 5 ml Heptanlösung, die zusätzlich 1,5 Vol% Isoamylalkohol enthielt, aus. Nach dem Absitzen der beiden Phasen erfolgt nach 15 - 20 Minuten das Abhebern der Heptanphasen, die gesammelt und mit einer Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet werden. Danach wurden 7 ml der Heptanphase mit 4 ml Reagens (50% ige H_2SO_4 + $10 \text{ mg}\%$ FeCl_3) versetzt, kräftig geschüttelt und weitere 5 - 10 Minuten auf einer Schüttelmaschine belassen. Die organische Phase wurde abgesaugt und der entstandene rote Farbstoff im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei 520 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Versuchsansatz, der an Stelle des Membran-Promethazinkomplexes unbehandelte Ghoststandardsuspension im jeweiligen Standardpuffer enthielt.

Zur Ermittlung des Promethazingehaltes aus den gemessenen Extinktionswerten erstellte man im Bereich von $0,5 - 3 \text{ mg}\%$ eine Eichkurve (Abb. 5)

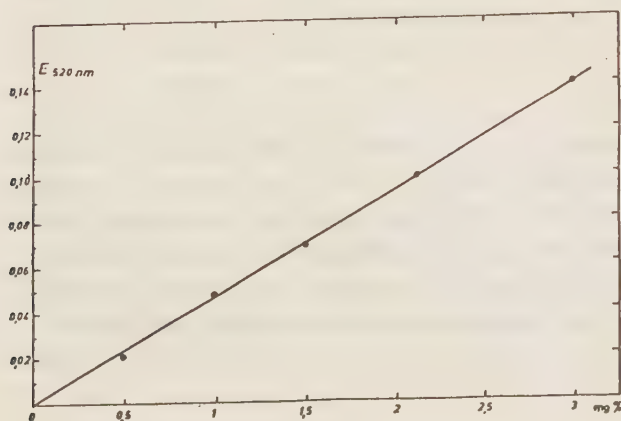


Abb. 5

Eichkurve zur
Promethazinbestimmung

3.8.2. Konzentrationsbestimmung von Promethazin in den I.O.- und R.O.-partikeln, erhalten durch trägerfreie Elektrophorese

Zur Promethazingehaltsbestimmung der rechten (I.O.) und linken Bande (R.O.) der Elektrophorese wurden ca. 40 ml Blut O⁺ wie unter 3.1. behandelt. Je 1,5 ml der erhaltenen Ghoststandardsuspension wurden mit Promethazininlösung nach 3.2.1. inkubiert. Anschließend homogenisierte man 2 Mal in 10 ml TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer pH 7,4. Diese "resealed ghosts" führte man in 30 ml Corex - Glastubes über, füllte mit obigen Kammerpuffer zur Marke auf und zentrifugierte 20 Minuten mit 20 200 xg bei 4°C.

Um den erhaltenen Rückstand in die trägerfreie Elektrophorese einspritzen zu können, mußte er nach 3.4.1.3. entsprechend mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer (Trennpuffer) verdünnt werden. Während des Laufes zeigte sich eine scharfe Trennung in eine linke (R.O.) und eine rechte Bande (I.O.), deren Fraktionen vereinigt, 2 Mal mit Kammerpuffer gewaschen, und wie oben in der Sorvall zentrifugiert wurden.

Die Ansätze zur Promethazinbestimmung (3.8.1.), wie auch der Blindwert sollten Proteinkonzentrationen zwischen 500 und 1500 µg/ml aufweisen. Die Proben wurden mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, auf ein Volumen von 1 ml gebracht.

3.8.3. Konzentrationsbestimmung in nicht homogenisierten ghosts

Um Hinweise zu erhalten, ob das Promethazinmolekül von Außen an einer (mehreren) Stelle (n) an der Membran angreift, sie einstülpt und Vesikel abschnürt, oder nur im Zuge einer durch osmotische Einflüsse verursachten Invagination in das Zellinnere eingeschlossen wird, wurden die mit Promethazin inkubierten ghosts (3.2.1.) nicht homogenisiert, sondern nach zweimaligem Waschen sofort in die trägerfreie Elektrophorese einge-

spritzt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, zentrifugiert wie bei 3.8.2. beschrieben und der quantitativen Testmethode 3.8.1. unterworfen.

3.8.4. Konzentrationsbestimmung in der oberen und unteren Bande des Dextrankissens (3.6.)

Es sollte zunächst der Promethazingehalt der unteren Bande (unsealed) bestimmt werden. Dieser sollte bei den ungeschlossenen Vesikeln und bei einer bloßen Einsiegelung des Moleküls während der Zentrifugation zu entfernen sein. Der Hauptanteil des in diesem Falle lose adsorbierten Promethazins wäre dann in der oberen Bande zu finden, die die geschlossenen (resealed) Vesikel enthält.

3.8.4.1. Konzentrationsbestimmung nach mehrmaligem Waschen

Hierzu wurde eine Ghoststandardsuspension mit Promethazin-HCl nach 3.2.1. inkubiert. Die Vesikulierdauer wurde mit 40 Minuten festgelegt. Danach wurde in 20 ml TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, homogenisiert, 20 Minuten lang mit 37 000 xg zentrifugiert (2 - 3 Mal wiederholen) und der Rückstand auf ein 3,14%iges Dextrankissen aufgetragen. Man zentrifugierte in der IEC-Beckman (3.6.) und nahm beide Banden in obigem Kammerpuffer auf. Nach zweimaligen Wasch- und Zentrifugationsschritten wurden die Proben auf 2,0 ml mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer aufgefüllt und je 1 ml zur quantitativen Promethazinbestimmung (3.8.1.) eingesetzt.

3.8.4.2. Konzentrationsbestimmung nach aufsteigender Dialyse

Die Vorbehandlung der ghosts für die Dialyse ändert sich gegenüber 3.8.4.1. nur dadurch, daß die Rückstände der unteren und oberen Bande nach den letzten beiden Zentrifugationsschritten (15 Minuten bei 37 000 xg) auf 5,0 ml (obere Band) bzw. 4,0 ml (untere Bande) aufgefüllt wurden. Je 3,0 ml füllte man in Cellophan Dialysierschläuche (Union Carbide, 8 mm) und häng-

te sie in eine mit Kammerpuffer gefüllte Säule K 16/20 (40 ml) der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden (36). Mit einer Planetenpumpe, LKB Instrument, Schweden, wurde 24 Stunden lang kontinuierlich TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4, von unten nach oben durch die Säule gepumpt (50 ml pro Std.) und Fraktionen von 10 ml in einem Fraktionsteiler aufgefangen. Danach wurden je 1 ml Retentat zur Promethazinbestimmung eingesetzt.

3.8.5. Sättigungsverhalten der oberen und unteren Bande

Von Wichtigkeit der Aussagen über den Bindungsmechanismus ist die Konzentrationsabhängigkeit der Membran-Promethazin Reaktion. Dazu wurden folgende Konzentrationsstufenversuche durchgeführt.

Je 3 ml Promethazininlösung der Konzentrationsstufen 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg pro 100 ml hypotonischen Phosphatpuffer, pH 7,6, wurden mit 3 ml Ghoststandardsuspension versetzt, 40 Minuten lang bei 37°C vesikuliert, 2 Mal in Kammerpuffer, pH 7,4, homogenisiert und in Corex-Glasröhrchen 15 Minuten bei 37 000 xg zentrifugiert. Jede Konzentrationsstufe wurde auf ein Dextrankissen aufgetragen und nach 3.6. behandelt. Anschließend mußten beide Banden 2 Mal mit Kammerpuffer in geeichten Polycarbonatröhrchen gewaschen und in der Spinco-Zentrifuge (Titan R 50 Rotor) 30 Minuten mit 25 000 Upm (37 700 xg) zentrifugiert werden. Das Pellet der oberen Bande füllte man mit Kammerpuffer auf 2,0 ml, das der unteren Bande auf 1,5 ml auf. Von jedem dieser 12 Werte wurde der Promethazin- und Proteingehalt bestimmt.

3.8.6. Auftrennung der Banden des Dextrankissens in der trägerfreien Elektrophorese

Die Kombination der Dichtegradientenzentrifugation mit der trägerfreien Elektrophorese erwies sich als ideale Methode, Ghostmembranen sowohl nach ihrem Zustand (offen oder geschlossen), als auch nach ihrer Oberflächenladung zu charakterisieren.

Während Steck (8,37) die obere Bande des Dextranskissens T 110 als homogene I.O.-Vesikel Population vorfindet, zeigt sich bei Heidrich et al. (5) eine elektrophoretische Auftrennung der oberen und unteren Bande, was man bei Zellmaterial nur einheitlicher Dichte nicht erwarten darf. Diesem Ergebnis kommt deshalb große Bedeutung zu, da für Versuche, wie Enzymteste oder Transportstudien, einheitliche Partikel vorhanden sein müssen. Ebenfalls sind quantitative Promethazinbestimmungen nur unter diesen Voraussetzungen sinnvoll.

Die Versuchsdurchführung begann wieder mit einer Inkubation von 4 Ansätzen je 1,5 ml Promethazin-HCl in hypotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6, mit der Ghoststandardsuspension (1:1), 40 Minuten bei 37°C (3.1.1.). Nach der Homogenisation, den Wasch- und Zentrifugationsschritten gemäß 3.3. wurde durch Dextranskissenzentrifugation (3.6.) die übliche Auftrennung in obere und untere Bande erreicht. Durch 2 maliges Waschen mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, und anschließender Zentrifugation bei 37 000 xg 20 Minuten lang wurden beide Banden von Dextranslösung frei gewaschen, danach mit Kammerpuffer elektrophoretischen Laufbedingungen (3.4.1.3.) angepaßt. Jede Bande des Dextranskissens spaltete sich während der Elektrophorese wiederum in eine linke (R.O.) und eine rechte Bande (I.O.), die jeweils einer Promethazinbestimmung unterzogen wurden.

3.9. Bindungsstudien

3.9.1. Beteiligung von hydrophoben Bindungen

Zu diesem Zweck wurde analog Versuch 3.8.5. verfahren. Eine Änderung zum Nachweis einer hydrophoben Bindung bzw. Wechselwirkung erfolgte lediglich bei der quantitativen Promethazinbestimmung: Es wurde die Originalmethode nach Krieglstein verwendet, d.h. eine Extraktion des Membran-Promethazinkomplexes ohne chaotrope Reagentien (38) und die modifizierte Bestimmungsmethode

mit chaotropen Agentien (Harnstoff) nach 3.8.1.

3.9.2. Beteiligung von Ionenbindungen

Da einige Autoren (16,39) das Bindungsvermögen polarer Reagentien mit Plasmamembranen nicht allein auf hydrophobe, sondern auch auf ionische Interaktionen zurückführen, wurde versucht, mit steigenden NaCl-Konzentrationen im hypotonischen Phosphatpuffer, pH 7,6, diese Ionenbindungen zu lösen. Man pipettierte je 1,5 ml Ghoststandardsuspension mit 1,5 ml Promethazin-HCl/Phosphatpuffer, pH 7,6, in 8 Corex-Glasröhrchen (15 ml), ließ 60 Minuten bei 37°C vesikulieren und zentrifugierte anschließend 15 Minuten lang bei 37 000 xg, 4°C. Nach Abnahme der Überstände wurde mit je 10 ml einer Salzkonzentrationsreihe (0,01M - 0,1M NaCl/Phosphatpuffer) 5 Mal gewaschen. Als Vergleichswert diente eine mit Phosphatpuffer, pH 7,6, behandelte Probe. Zum Schluß füllte man die unter obigen Bedingungen zentrifugierten Proben mit dem jeweiligen Puffer auf 2,0 ml auf und bestimmte den Promethazingehalt.

3.9.3. Rangstellung der Ionenbindung

Obwohl als Grund für die Einstülpungen Interaktionen der Membranen mit polaren Drogen durch hydrophobe Wechselwirkungen oder/und Ionenbindungen verantwortlich gemacht werden können, war es notwendig festzustellen, welche der beiden Bindungsarten überwiegt.

Hierzu wurden in 2 Corex-Röhrchen (15 ml) je 2,0 ml Ghoststandardsuspension mit 2,0 ml 10^{-3} M Promethazin-HCl/Phosphatpuffer, pH 7,6, dem noch 0,04M NaCl zugegeben wurde, bei 37°C inkubiert. Man bestimmte die Inkubationsdauer nach dem Vesikulierungsgrad, der ständig im Phasenkontrastmikroskop verfolgt wurde. Nach 10 - 15 Minuten waren die Membranen entsprechend Abb.6 eingestülpt, hatten aber noch keine Vesikel nach Innen abgeschnürt. Die Endozy-

tose wurde durch Abkühlen auf 0°C (30 Min.) unterbrochen, während eine Vergleichsprobe weiterhin bei 37°C belassen wurde. Beide bis dahin analog behandelte Proben wäscht man mit hypotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6, und zentrifugiert bei 37 000 xg 15 Minuten lang bei 4°C. Die Membranen des einen Zentrifugierröhrchens werden nun nochmals mit 2,0 ml Promethazin-HCl/Phosphatpuffer, pH 7,6, bei 37°C, 60 Minuten lang inkubiert. Die andere Probe wird analog behandelt, nur mit dem Unterschied, daß 2,0 ml hypotonischer Puffer, pH 7,6, ohne Promethazin-Zusatz dazupipetiert wird. Nach ca. 60 Minuten wurden die unterschiedlichen Vesikulierstadien im Mikroskop beobachtet und durch fünfmaliges Waschen mit 0,005 M Phosphatpuffer der Überschuß an Promethazin entfernt. Es folgte die übliche Promethazin- und Proteinbestimmung zur Berechnung des spezifischen Promethazingehaltes.

3.9.4. Charakterisierung der Bindung

Ziel dieses Versuches sollte es sein, die Bindungsarten des Promethazinkonzentrationsreihe (15 - 45 mg%), gelöst in hypotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6, bei 37°C. Nach 1 Stunde werden die Proben bei 38 000 xg 20 Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände nimmt man vorsichtig ab, wirbelt die sedimentierten Membranen mit je 1 ml Phosphatpuffer auf und wiederholt den Zentrifugationsschritt. Die Überstände werden vereinigt, und wie die Membranen mit obigem Puffer zu 3 ml bzw. 2 ml aufgefüllt. Von beiden Proben erfolgte eine Promethazin- und Proteinbestimmung.

Man inkubierte 1 ml Ghoststandardsuspension mit je 1 ml einer abgestuften Promethazinkonzentrationsreihe (15 - 45 mg%), gelöst in hypotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6, bei 37°C. Nach 1 Stunde werden die Proben bei 38 000 xg 20 Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände nimmt man vorsichtig ab, wirbelt die sedimentierten Membranen mit je 1 ml Phosphatpuffer auf und wiederholt den Zentrifugationsschritt. Die Überstände werden vereinigt, und wie die Membranen mit obigem Puffer zu 3 ml bzw. 2 ml aufgefüllt. Von beiden Proben erfolgte eine Promethazin- und Proteinbestimmung.

3.10. Radioaktives Promethazin

3.10.1. Katalytische Tritiierung im Modellversuch

Um das Promethazinmolekül an der Membran lokalisieren zu können. (mit Hilfe von Autoradiographie und zur Bestimmung in kleinsten Mengen), sollte es in radioisotopmarkierter Form eingesetzt werden. Eine Totalsynthese mit ^{14}C und ^3H im Molekül erschien finanziell aufwendig. Die Alternative war eine katalytische Tritiierung. Um die bei dieser Tritiierungsform notwendigen Reaktionsbedingungen und die entstehenden Nebenprodukte zu ermitteln, wurde die von Firma Buchler, Amersham, England, vorgeschlagene Methode der Tritiierung auf kaltes Promethazin-HCl angewendet (40,41). Alle Arbeiten mit heißem Material wurden in einem eigens dafür vorgesehenen radiochemischen Labor durchgeführt. Flüssige, offene, radioaktive Substanzen wurden nur im Isotopenabzug und mit Gummihandschuhen behandelt. Mengen unterhalb der Freigrenze wurden unter Vorsichtsmaßnahmen im normalen Labor bearbeitet.

1 g Promethazin-HCl werden mit 4 ml bidest. Wasser und 0,2 g Platin-Aktivkohle Hydrierkatalysator bei 90 - 100°C unter Rückfluß und ständigem Rühren, 12 - 15 Stunden lang, erhitzt. Es war notwendig, den Modellversuch unter Lichtausschluß und unter Stickstoffatmosphäre auszuführen, da sonst gefärbte Reaktionsnebenprodukte auftraten.

Um die Aktivkohle abzutrennen, wurde oben behandelte Suspension in einem 30 ml Plastikröhrchen bei 48 200 xg 20 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde über eine Glasfilternutsche 26 G 2 filtriert. Das Filtrat wurde im Scheidetrichter mehrmals mit 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Dabei kann es bei zu großer Lichteinwirkung zu einer leichten Rotfärbung kommen und es wurde nach Möglichkeit unter Lichtausschluß gearbeitet.

Die vereinigten Chloroformauszüge wurden am Rotationsverdampfer eingengt und einer DC-Chromatographie unterworfen (42).

Laufmittel: Chloroform - Methanol (65 : 35)
Trägermaterial: Kieselgel G_{F254} präp. Platte (Fluoreszenzplatte)
Detektion: a) UV-Lampe
b) Dragendorff-Reagens

3.10.2. Präparative Reinigung von tritiiertem Promethazin

Das von Firma Buchler, Amersham, England, tritiierte Promethazin war von pulvriger Konsistenz und hatte dunkles Aussehen; Gesamtmenge 1,1 g = 100 mCi (im Gegensatz zu dem der Firma zur Tritiierung gelieferten weißen Kristallpulver).

Zur Reinigung wurden 100 mg dieses "heißen" Materials in Wasser oder Chloroform gelöst, mit einem Dispensiergerät (Desaga Autoliner nach Stahl) auf eine präparative Kieselgelplatte G_{F254} aufgetragen und über Nacht in einer gesättigten Kammer entwickelt (3.10.). Nach Detektion mittels UV-Lampe wurde die so ermittelte Substanz abgekratzt und mit ca. 500 ml Methanol (mit 0,1 N HCl auf pH 3-4 angesäuert) vom Kieselgel eluiert und das Eluat filtriert. Nach dem Einrotieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, füllte man den Rückstand mit hypotonischen Phosphatpuffer, pH 7,6, zu 25 ml auf (Stammlösung). Diese Stammlösung wurde im Dunkeln bei + 4°C aufbewahrt (ca. 6 Monate). Eine Gehaltsbestimmung konnte spektralphotometrisch bei 248 nm und 300 nm gegen Pufferlösung oder mit der modifizierten Testmethode nach Krieglstein (35) erfolgen (20 mg Promethazin in 25 ml = 1000 μ Ci/25 ml).

3.10.3. Reinheitsprüfung

3.10.3.1. Reinheitsprüfung in der trägerfreien Elektrophorese

Um sicher zu sein, daß das DC-gereinigte, radioaktive Promethazin (3.10.2) keine Nebenprodukte enthält, wurden 1 ml der heißen Substanz (Stammlösung) mit den bei 3.4.1.3. beschriebenen

nen Bedingungen der trägerfreien Elektrophorese unterworfen. Alle 92 Fraktionen wurden aufgefangen und eine ^3H -Radioaktivitätsbestimmung im Packard-Szintillationszähler (Insta-Gel) durchgeführt.

Um in den 92 Elektrophoresefraktionen die Lage des Promethazingipfels zu ermitteln, unterwarf man 2 ml einer $2 \times 10^{-3}\text{M}$ Promethazin-HCl Lösung den in 3.4.1.3. beschriebenen Elektrophoresebedingungen und ermittelte das Maximum wie unter 3.10.2. beschrieben (Blindwert). Dieses Maximum ist der Bezugspunkt für die Elektrophorese des tritiierten Promethazins.

3.10.3.2. DC - Analyse

Eine weitere Reinheitsprüfung erfolgte auf einer analytischen Dünnschichtplatte, so wie unter 3.10. beschrieben um sicher zu sein, daß sich während der Präparation der Stammlösung nicht wieder Nebenprodukte gebildet hatten.

3.10.4. Herstellung einer ^3H -Tracer Lösung

1 ml der "heißen" Stammlösung (3.10.2.) wurden mit 2 ml einer $2 \times 10^{-3}\text{M}$ "kalten" Promethazin-HCl Lösung der trägerfreien Elektrophorese unterworfen. Von den Fraktionen im (-) Polbereich führte man ^3H -Aktivitätsbestimmungen durch (Insta-Gel), wobei die hoch radioaktiven Fraktionen des Kathodenpeaks vereinigt und anschließend in einer VIRTIS-Gefriertrockenapparatur eingengt wurden. Im erhaltenen Extrakt wurde die Promethazin-Konzentration bestimmt, sodann diese mit kaltem Promethazin auf 32 mg erhöht und mit hypotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6, auf 100 ml aufgefüllt, so daß die Endkonzentration an Promethazin 10^{-3}M betrug.

3.11. Lokalisierung des ^3H -Promethazinmoleküls auf der Membranoberfläche

Mit Hilfe der Autoradiographie im Elektronenmikroskop (3.13.1.)

sollte rein qualitativ festgestellt werden, ob das Promethazinmolekül stabil an die Membran gebunden ist. Quantitative Aussagen sollten mit dem radioaktiven Promethazin nicht gemacht werden, da der optische Test (3.8.1.) sehr genaue Ergebnisse liefert und gerade ein tritiiertes Reagenz zu Fehlergebnissen führen kann (Austauschreaktion!). Es war ebenfalls nicht zu erwarten, daß die Methode erlaubt, die Orientierung des Promethazinmoleküls an der Membran zu erkennen.

3.11.1. Abtrennung von freien und gebundenen ^3H -Promethazin

Um sicher zu sein, daß nur Membranen mit gebundenem ^3H -Promethazin zur Autoradiographie eingesetzt wurden und kein freies ^3H -Promethazin vorhanden war, wurden ghosts mit tritiiertem Promethazin nach 3.1.2. und 3.2.1. inkubiert und auf trägerfreier Elektrophorese gereinigt. Nach Ermittlung der Protein- und ^3H -positiven Fraktionen (Solune, Insta-Gel), wurden die vereinigten R.O.- und I.O.-Partikel, sowie die Ausgangssuspension dem Einbettungsverfahren (3.13.) unterworfen.

3.11.2. Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Alle Membranpräparate wurden nach dem "positive staining" Verfahren behandelt. Mit Glutaraldehyd (2,5% in TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer, pH 7,4) wurden die Proben zunächst 60 Min. in Eis vorfixiert, mit demselben Puffer ohne Glutaraldehyd gewaschen und 2 Stunden mit Os-IV-oxid (1%) nachfixiert. Eine anschließende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, iso-Propanol) entwässerte die fixierten Präparate, die man sodann in Eponharz einbettete (43). Für autoradiographische Zwecke mußte das Harz wie folgt zubereitet werden (44):

5,5 g Lösung A (76,26 Epon 812, 100,5 g Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid)

24,4 g Lösung B (123 g Epikot, 108,58 g Methyl nadic anhydride)
0,34 g Beschleuniger (a a' a''-Tris-(dimethylaminomesitol)

Dieser Eponmischung wurden 360 mg PPO (2,5 Diphenylaxazol) hinzugegeben, wobei es aus Gründen der Löslichkeit zweckmäßig war, diesen Szintillator vor Zugabe des Beschleunigers in den Komponenten unter langsamen Rühren aufzulösen (45). Das oben genannte Isomerengemisch erwies sich als relativ gutes Solvens. Die Polymerisation des Harzes erfolgte bei 60°C über 48 Stunden.

3.11.3. Schnitttherstellung für elektronenmikroskopische Autoradiographie

Nach der Polymerisation des Harzes wurden auf einem Ultratome III/LKB mit einem Glasmesser 800 Å-Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kollodium beschichtete Silbernetze der Firma Fournitures Pour Labratories, Paris, aufgefischt. Silbernetze zeigten gegenüber Kupfernetzen einen sehr geringen Nullwert, was auf Differenzen der Elektronennegativität der beiden verwendeten Metalle Silber und Kupfer zurückzuführen ist. (46). Nach dem Trocknen wurden die mit Schnitten versehenen Silbernetze auf selbstgefertigte Hart-PVC-Präparatehalter mit Gummilösung leicht angeklebt.

3.11.4. Befilmung der Silbernetze

Die folgenden Arbeiten werden in einem verdunkelten Raum bei schwachem Gelblicht (z.B. Ilford-Safelight 902 S) durchgeführt. Es wurden ca. 7 g Ilford Nuclear Research Emulsion L4 in Gel-form mit 0,8 Teilen bidest. Wasser versetzt. Die Emulsion wurde zunächst 60 Min. lang bei 50°C unter vorsichtigen Rühren mit einem Kunststoffstab kolloidal in Lösung gebracht, dann weitere 12 Stunden bei 40°C im Wasserbad belassen, um ein vollständiges Quellen der Filmgelatine zu ermöglichen. Die Emulsion wurde als Einkornschicht nach der Schlingenmethode (47,48) aufgetragen, mit Glasschlingen einer Länge von etwa 30 mm und einer Breite von 15 mm (3 mm Glasdurchmesser). An der oberen Schmalseite war ein ca. 100 mm langes Glasstäbchen angeschmolzen. Man tauchte

die Schlinge in die Emulsion, ließ nach dem Herausnehmen abtropfen und stellte die Glasschlinge mittels eines durchbohrten Kunststoffstopfen lotrecht auf. Nach ca. 1 Minute wurde das Gellieren der Einkornschicht durch auftretende Interferenzfarbzonen sichtbar, die sich von unten nach oben ausbreiteten. Nun stülpte man das Emulsionshäutchen möglichst mit dem homogensten Teil des Häutchens von oben über den mit einem Silbernetz (mit Präparat) versehenen PVC-Halter und sorgte durch leichtes Anhauchen für besseren Kontakt zum Präparat. Zu jeder Versuchsserie wurde ein Blindwert mitbefilmt.

3.11.5. Expositionszeit und Entwicklung

Die emulsionsbedeckten Präparate werden zur autoradiographischen Exposition in mikroskopische Präparatekästchen eingelegt, mit einer Alufolie lichtdicht verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Expositionszeit richtet sich nach der Radioaktivität im Schnittpräparat, nach der Schnittdicke und der Beschaffenheit der Emulsionsschicht (49).

Um festzustellen, ob hinreichend lang exponiert wurde, entnahm man in angemessenen Zeitspannen (3 - 5 Wochen) Kontrollpräparate, die man nach der Entwicklung im Elektronenmikroskop prüfte. Die Entwicklung erfolgte mit dem Kodak D76-Developer 4 Minuten bei schwachem Gelbfilterlicht. Nach einer kurzen Zwischenwässerung (1 Minute), fixierte man 8 Minuten mit einem üblichen Fixierer und wässerte anschließend 15 - 20 Minuten.

3.11.6. Elektronenmikroskopie

Nach Doppelkontrastierung der Schnitte mit Bleizitrat und Uranylacetat erfolgte die Betrachtung der Präparate mit einem JEM T7 Elektronenmikroskop der Firma JEOL, Tokyo, bei 60 KV. Die Primärvergrößerung betrug 10 000. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden mit dem Agfa-Scintialfilm 23 D 56 gemacht und auf Agfa-Normalphotopapier abgezogen. Die Photographie-Vergrößerung war 2,5-fach.

4. Ergebnisse

4.1. Präparations- und Trennungsmethoden

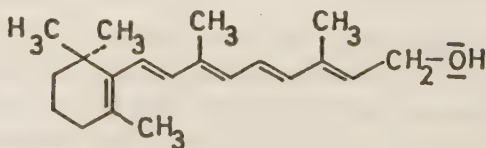
4.1.1. Stabilität der unsealed ghosts

Aus 50 ml Frischblut O^+ wurden 25 - 27 ml Ghostmembranen gewonnen. Diese waren nach dem letzten Zentrifugationsschritt bei 20 200 xg frei von Hämoglobin und hatten Proteinkonzentrationen zwischen 3,5 - 4,0 mg/ml. Die Membranen wurden, sofern keine andere Präparationsmethode angegeben, in 0,005 M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 -Puffer, pH 7,6, bei $0^\circ C$ aufbewahrt und zeigten auch nach 2 Tagen keinerlei morphologische Veränderungen im Phasenkontrastmikroskop.

4.1.2. I.O.-Vesikulierung der ghosts

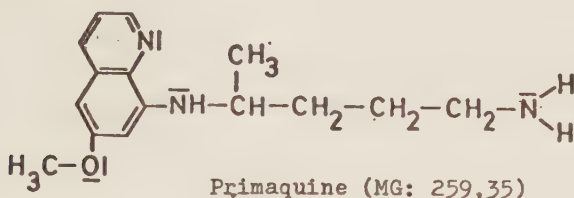
Für eine Endozytose kommen nach WEED (50) mehrere Reagentien in Frage, die auch als stomatocytogene Moleküle oder Cupformer bezeichnet werden. Zur Auswahl für Vesikulierungsversuche standen Vitamin A, Primaquine, und Promethazin, wobei quantitative Versuche generell mit letzterem Agens durchgeführt wurden.

Vitamin A₁ ($C_{20}H_{30}O$), ist ein monozyklischer, ungesättigter, primärer Alkohol und stand als wassermischbares Vitamin A-Trockenpulver (Firma Merck) zur Verfügung.

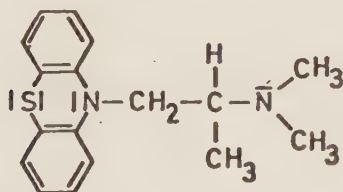


Vitamin A (Retinol) MG: 286,46

Primaquine (= 8-{4-Aminopentylamino}-6-methoxy-chinolin), $C_{15}N_3O H_{21}$, wird als gametozides Mittel zur Malariabekämpfung eingesetzt. Wirksames Agens scheint die 8-Aminochinolingruppe zu sein, da auch Chloroquin (Resochin^R) ähnliche therapeutische Effekte zeigt. Die aliphatische Seitenkette mit der endständigen primären Aminogruppe, verleiht dem Primaquine entsprechende Polarität.



Promethazin (= 10-{2 - Dimethylaminopropyl} -phenothiazin), $C_{17}N_2S H_{20}$, zählt zur therapeutischen Gruppe der Neuroleptika, wurde aber ursprünglich als Antihistaminikum eingesetzt, bis bei der Therapie allergischer Erkrankungen Nebenwirkungen in Form von Müdigkeit und zentraler Dämpfung auftraten.



Promethazin (MG: 284,42)

Als wichtigste Substanz, gewissermaßen als Prototyp der Phenothiazinderivate, erwies sich Chlorpromazin (Megaphen^R) und Promethazin (Atosil^R, Phenergan^R). Während eine Substitution in Position 3 nicht obligat ist, und keinerlei biologische Wirkungsänderungen gegenüber der unsubstituierten Form hervorruft, taucht die Seitenkette in offener oder versteckter Form bei vielen Arzneimitteln dieser Therapiekategorie immer wieder auf.

Um die I.O.-Vesikulierung studieren zu können, werden die stomatocytogenen Substanzen in 0,005 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 7,6, gelöst und mit der Ghostsuspension im Verhältnis 1:1 inkubiert. Der optimale Konzentrationsbereich für eine Endozytose liegt für Primaquine und Promethazin bei $c = 5 \times 10^{-4}$ bis $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ (7). Allerdings mußte man auf Grund der Unlöslichkeit der Basen im wässrigen Milieu auf Salzverbindungen zurückgreifen (Primaquine-Diphosphat bzw. Promethazin-HCl).

Eine Endozytose der Ghostmembranen erfolgte nur bei $36 - 37^\circ\text{C}$ und war nach ca. 60 Minuten beendet. Eine Verzögerung der Vesikulierbereitschaft konnte bei 20°C festgestellt werden, bis hin zum völligen Ausbleiben bei 0°C . Somit konnte für Endozytosereaktionen im Phosphatpuffer eine Temperaturabhängigkeit beobachtet werden, die gegebenenfalls in anderen Puffersystemen, wie Tris-HCl (51), nicht so ausgeprägt vorhanden ist. Mit Substanzen, die R.O.-Vesikulierung bewirken, wurde nicht gearbeitet.

4.1.3. Beobachtung und Definition einer I.O.-Vesikulierung unter lichtmikroskopischen Aspekten

Nachdem die Ghostsuspension mit einer membranaktiven Substanz im Verhältnis 1:1 bei 37°C inkubiert war, wurden in gewissen Zeitabständen Proben entnommen, im Phasenkontrastmikroskop betrachtet und Blitzlichtaufnahmen gemacht (3.5.1.). Es zeigten sich bereits nach 5 - 10 Minuten gut erkennbare Einstülpungen (Abb. 6), die z.T. an 2 bis 3 Stellen der Membran auftraten. Nach weiteren 10 - 15 Minuten war die Vesikulierung schon so weit fortgeschritten, daß einige Ghostmembranen bereits Vesikel in sich trugen (Abb. 7).

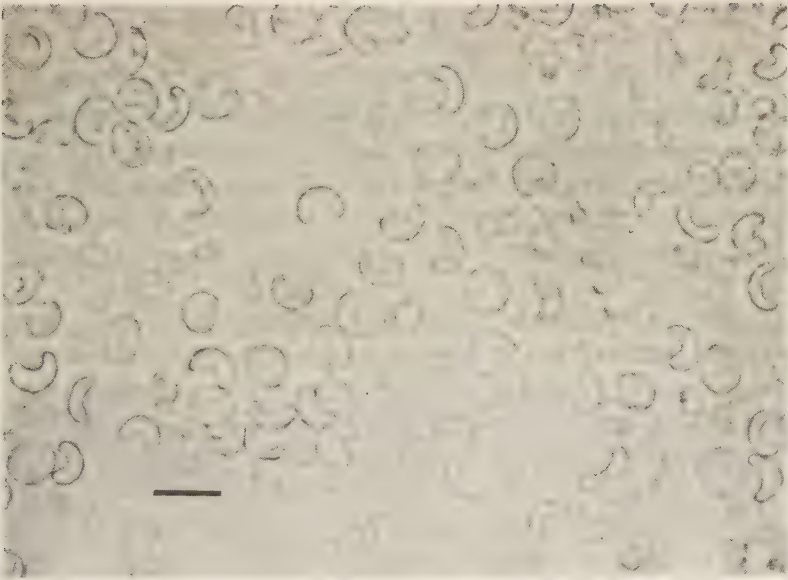


Abb .6: Endozytose nach 10 Minuten (Balken = 10 μ m)

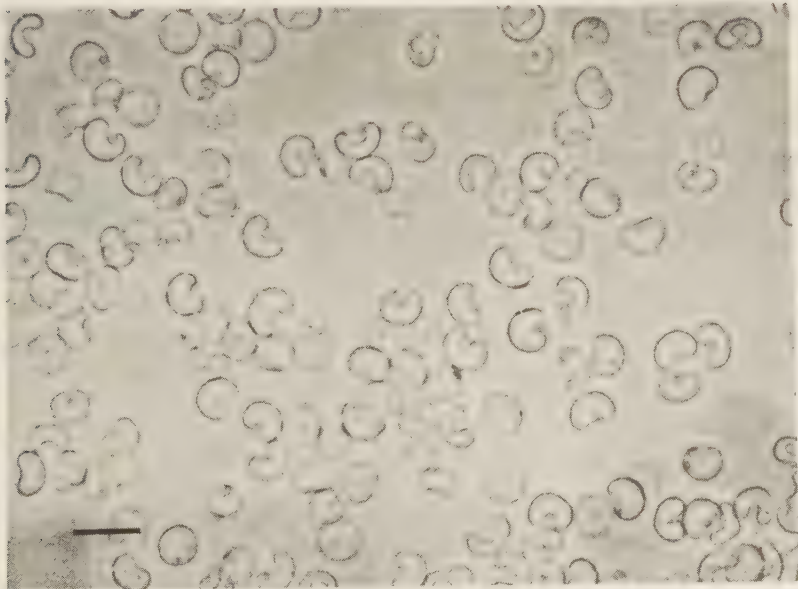


Abb. 7: Endozytose nach 20 Minuten (Balken = 10 μ m)

Die Vesikulierung war in der Regel nach 50 bis 60 Minuten beendet. Jede Ghostmembran hatte nach Innen mehrere Vesikel abgeschnürt, die optisch keinerlei Verbindungspunkte mehr mit der ursprünglichen Membran hatten, sondern selbständige Partikel waren.

Der Einstülpungsprozeß galt als gelungen und vollendet, wenn nach 60 Minuten die mit genannten Substanzen behandelten Ghostmembranen einen Zustand wie in Abb. 8 zeigten. Es mußten im Blickfeld des Photomikroskopes mindestens 90% aller ghosts mehr als ein Vesikel beinhalten. Ferner durften keine Ausstülpungstendenzen nach Außen oder freiliegende Vesikel auftreten. Die Endozytosereaktion mit Promethazinzusatz lief derart gesteuert ab, daß selbst nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden kein entscheidender Membranzerfall zu beobachten war. Eine Vesikulierung, die alle diese Anforderungen erfüllte, konnte als "kontrollierte Vesikulierung" bezeichnet werden.

Im Gegensatz dazu wurde als Vergleich sowohl eine Behandlung nur mit 0,005 M Phosphatpuffer, pH 7,6, bei 37°C durchgeführt, als auch die Vesikeldarstellung nach Steck (8) herangezogen. Hierbei zeigte sich bereits nach 10 Minuten gegenüber der mit Promethazin ausgelösten Endozytose ein starker Zerfall der Membranen; es traten nicht nur Einstülpungen nach Innen und Außen auf, sondern auch sehr viele Membranbruchstücke (unkontrolliert).

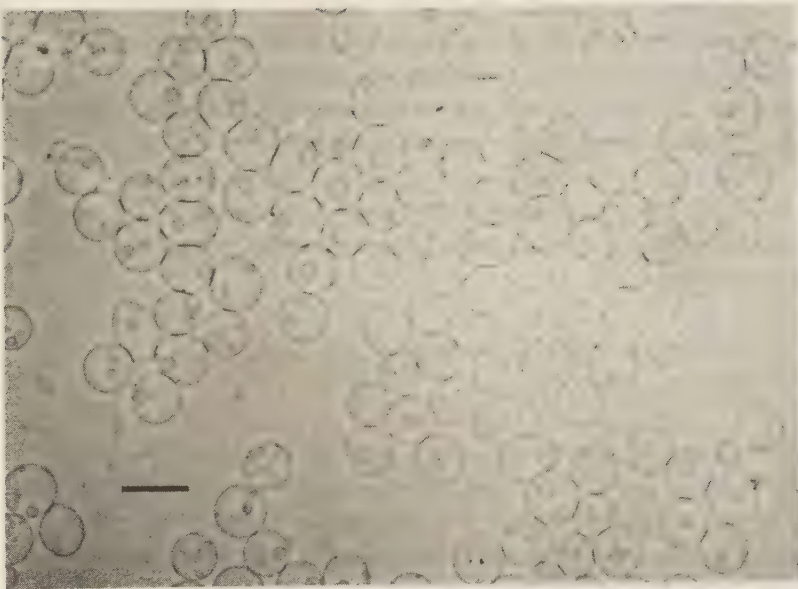


Abb. 8: Beendete Endozytose nach ca. 60 Minuten
(Balken = 10 μm)

4.1.4. Homogenisation

Da beim Homogenisieren, d.h., beim Freisetzen der Vesikel aus den ghosts, im Falle der Anwendung von Ultraschall wichtige Membranbestandteile verloren gingen und bei Anwendung einer French-press nur noch Membranstücke erhalten wurden, mußte auf die relativ schonende Methode einer 27 gauge Nadel zurückgegriffen werden (3.3.). Die behandelte Ghostsuspension wird vorsichtig durch die Kanüle gepreßt, wodurch es infolge von Scherkräften zu einer kurzfristigen Öffnung der Membran und damit zur Freisetzung der I.O.-Vesikel kommt. Jede Homogenisation verlief nie vollkommen quantitativ, so daß immer noch in einigen Ghostmembranen I.O.-Vesikel vorhanden waren.

Versuche, die I.O.-Vesikel mittels eines oder mehrerer Siebe (100 mesh) aus den Ghostmembranen zu befreien, waren nicht eindeutig reproduzierbar.

4.1.5. Elektrophoretische Trennung von ghosts und I.O.-Vesikeln

Die Trennung der I.O.-Vesikeln von den Ghostmembranen, bzw. R.O.-Partikeln, beruht auf dem unterschiedlichen Neuraminsäureanteil beider Populationen (7) auf ihrer Oberfläche. Nach der Endozytose findet man die ursprünglich auf der Membranaußenseite befindliche Neuraminsäure bei den sich bildenden I.O.-Vesikel Innen. Die Partikel sind somit weniger stark negativ aufgeladen und werden demzufolge weniger stark zur Anode hin abgelenkt. Diese I.O.-Vesikel sammeln sich nach den in 3.4.1.3. angegebenen Bedingungen in den Fraktionen 42 - 46, mit einem Maximum bei Fraktion 44.

Intakte ghosts, wie R.O.-Partikel werden durch negativen Ladungsüberschuß sehr weit zur Anode abgelenkt und laufen in den Fraktionsbereich 32 bis 36, mit einem Maximum bei Fraktion 34.

Die beiden Maxima lagen bei jeder Trennung ca. 10 Fraktionen auseinander (Abb. 9A). Die trägerfreie Elektrophorese bietet somit eine ideale, eindeutige Methode, ein Homogenat von I.O.-Vesikeln, ghosts bzw. R.O.-Partikeln in zwei scharfe Banden zu trennen und zwar auf Grund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladungen. Ein weiterer Beweis, daß nur die Oberflächenladung bei der Auftrennung eine Rolle spielt, ist aus Abb. 9B ersichtlich.

Hier wurde Promethazin behandeltes, aber nicht homogenisiertes Material in die trägerfreie Elektrophorese eingespritzt und wiederum nur eine Bande im Bereich der Fraktionen 32 bis 36 festgestellt. Trotz vieler inkorporierter I.O.-Vesikel kam es nicht zu einer Beeinflussung der relativ starken negativen Ladung, so daß man im Gegensatz zum homogenisierten Material nur eine scharfe linke Bande beobachtete (Abb.9B).

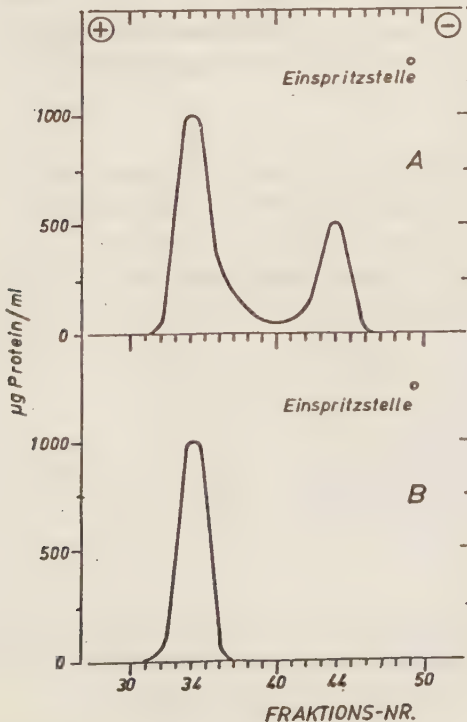


Abb. 9:

Trennungsprofile von
trägerfreien Elektro-
phoreseläufen (Protein-
verteilungskurven)
(A) I.O.-Vesikulierung
durch Promethazinbe-
handlung der ghosts

(B) Promethazin be-
handelte, aber nicht
homogenisierte ghosts

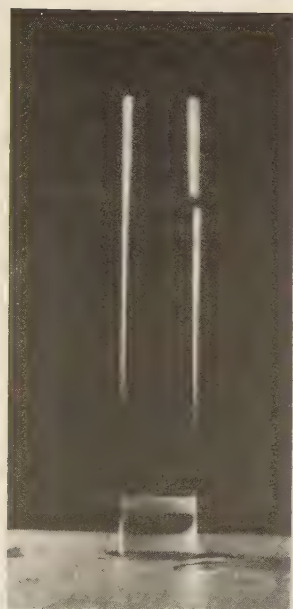
4.1.6. Dextrankissen

4.1.6.1. Banden im Dextrankissen

Sobald man "unsealed ghosts" (3.1.1.) erhöhten Temperaturen aussetzt (0° - 37°C), geht ein gewisser Prozentsatz in den resealed Zustand über. Analog treten bei mit Promethazin bis 37°C behandelten Membranen nach der Vesikulierung und Homogenisation Vesikel auf, die entweder offen oder geschlossen sind.

Durch Anwendung eines 3,14%igen Dextrankissens (3.6.) bei einstündiger Zentrifugation mit 100 000 xg werden beide Populationen voneinander getrennt (Abb. 10A - 10B). Die Membranen, die nach einer bestimmten Inkubationsdauer noch offen sind, sinken durch Eindringen der Dextranlösung auf den Boden des Röhrchens, während die geschlossenen Partikel am Auftragspunkt bleiben. Der Proteinanteil der unteren Bande verringert sich mit zunehmender Inkubationsdauer, so daß nach ca. 90 Minuten nur noch ein leichter Schleier zu sehen ist, d.h. fast nur noch geschlossene Vesikel vorhanden sind.

Bei nicht homogenisierter Probe erfolgte keine Aufspaltung in zwei Banden. Erst nach Homogenisation nimmt die untere Bande von 1 x bis 3 x homogenisieren leicht zu. Auch bei nur 15 bis 30 minütiger Inkubation und 2 maligem Homogenisieren ließ sich die untere Bande nicht nennenswert erhöhen (Abb. 10C).



Auftrag
geschlossene →
("sealed") Vesikel

← offene ("leaky") →
Vesikel

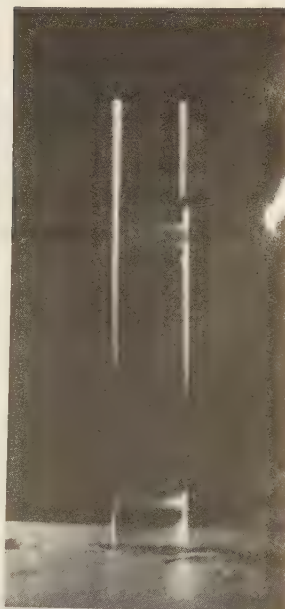


Abb. 10 A: "offene" (unsealed)
ghosts

Abb. 10 B: Auftrennung in "geschlos-
sene" und "offene" ghosts
nach 40-minütiger In-
kubation bei 37°C

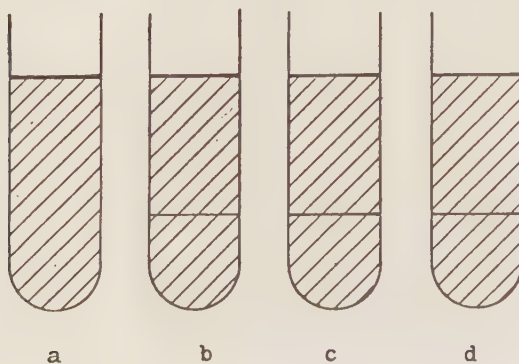


Abb. 10 C: Einfluß der Homogenisation auf die Banden des Dextran-
kissens. a = nicht homogenisierte Membranen; b = 1 x homo-
genisiert; c = 2 x homogenisiert; d = 3 x homogenisiert

Bei Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop zeigt die untere Bande neben Vesikeln auch Ghostmembranen, die durch Wärmebehandlung noch nicht wieder geschlossen waren, bzw. der Vesikulierungsprozeß noch nicht abgeschlossen war. In der oberen Bande findet man kleine geschlossene I.O.-Vesikel und Ghostmembranen, z.T. noch mit Vesikeln, die trotz Homogenisation nicht quantitativ aus der ursprünglichen Ghost freigesetzt werden konnten.

4.1.6.2. Membrancharakterisierung der Banden des Dextrankissens durch SDS-Gelelektrophorese

Um untere und obere Bande des Dextrankissens näher zu charakterisieren, wurden 7,5% SDS-Polyacrylamidgele (3.4.2.) gefahren, die zeigen sollten, daß es sich um ein und denselben Membrantyp, zumindest von der Proteinzusammensetzung her, handelt.

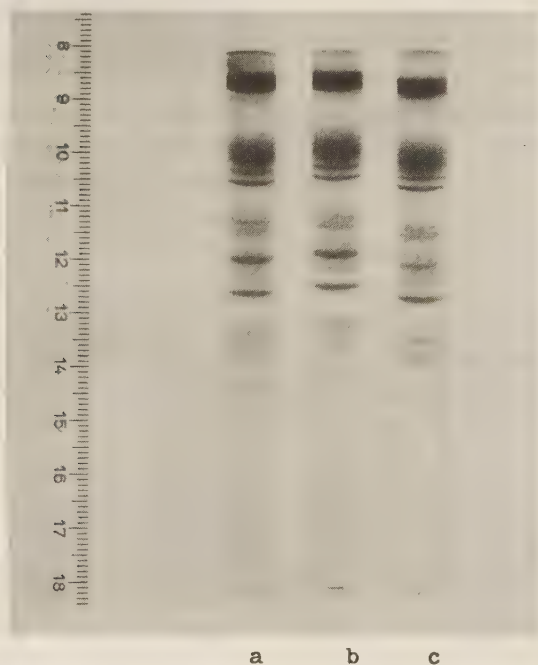


Abb. 11: Proteinmuster (7,5%-ige SDS-Gele)
a = obere Bande; b = Ghoststandardsuspension; c = untere Bande; aufgetragen: 100 µg Protein/Stäbchen

Um genug Ausbeute der unteren Bande zu erhalten, wird die Inkubationsdauer von 60 auf 35 Minuten reduziert. Die Abbildung 11 macht deutlich, daß kein Proteinunterschied die obere Bande im Dextranskissen charakterisiert, sondern die Proteinmuster beider Banden der Ghoststandardsuspension gleicht.

4.1.6.3. Phospholipidgehalt

Um zu beweisen, daß die Trennungen auf dem Dextranskissen nicht auf Grund unterschiedlicher Lipidanteile beruhen, wurde der Gesamtghostlipidgehalt bestimmt. Die Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes und Phospholipidgehaltes (Boehringer Test 15620) wird mit Membranmaterial ausgeführt, das unter streng phosphatfreien Bedingungen hergestellt wurde (10). Die ermittelten Werte sind nahezu identisch in beiden Banden.

	untere Bande	obere Bande
berechnet auf		
Gesamtphosphor:	3,6 mg/100 ml	2,9 mg/100 ml
Phospholipid:	3,5 mg/100 ml	2,75 mg/100 ml
spez. Gesamtphos:	1,0	0,80
spez. Phospholipid:	0,95	0,75

Bei einem Vergleich der auf mg Protein bezogenen Gesamtphosphor- bzw. Phospholipidgehalte der oberen und unteren Bande, weichen beide Quotienten nur geringfügig voneinander ab. Dieses spricht wiederum für eine Trennung auf dem Dextranskissen nach dem Kriterium leaky-resealed. Bei Trennung auf Grund reiner Dichteunterschiede würde der etwas höhere spezifische Lipidgehalt der unteren Bande einen gegenteiligen Trenneffekt auslösen.

4.1.6.4. Verhalten von isoionischen ghosts im Dextranskissen

Ghostdarstellungen im isoionischen Milieu (3.1.2.), sollen dazu dienen, die Kriterien für die Auftrennung im Dextranskissen zu analysieren.

Mit der Methode nach Finean (11) kann man die Erythrozyten bei 20°C mittels isoionischen Puffer, dem Glycerin beigefügt wird, öffnen und anschließend durch sofortiges Überführen in eiskalten Puffer ohne Glycerin wieder schließen. Durch viermaliges Wiederholen dieses Vorganges tritt schrittweise Hämoglobin aus, das durch Zentrifugieren abgetrennt werden kann. Man erhält ghosts, die höchstens Spuren von Hämoglobin enthalten. Permeabilitätsstudien (33) ergaben, daß diese isoionischen Membranen resealed sind.

Diese Tatsache bestätigt auch eine Zentrifugation auf dem 3,14%igen Dextranskissen (Abb. 12); alle Membranen sind wieder geschlossen und bilden die obere Bande des Kissens.



Abb. 12:

resealed ghosts unter
isoionischen Bedingungen

4.1.6.5. Verhalten von ^{14}C -Saccharose

Durch Zugabe von ^{14}C -Saccharose (20 μl = 0,5 μCi) zur Membran-Promethazinsuspension vor der Temperaturerhöhung auf 37°C , wird erreicht, daß die Radioaktivität im Zuge des Schließens der Membran mit eingesiegelt wird (3.6.1.). Durch Waschen der im Dextranskissen getrennten Banden mit Puffer unter Zusatz von kalter Saccharose, wird eine rapide ^{14}C -Aktivitätsabnahme der unteren Bande (<1000 Cpm) gefunden, während sich die obere auf einen konstanten Wert von 100 000 Cpm einstellte (Abb. 13). Das Mengenverhältnis obere/untere Bande betrug 2:1 (Proteinwert!). Somit kann definitiv bewiesen werden, daß für die Durchführung von Permeabilitätsstudien mit Substanzen, für die keine Carriersysteme existieren sondern auf die reine Diffusionsgesetze anzuwenden sind, und die, zumindest nach vorliegenden Versuchen, größer als Saccharose sind, die Dextranskissenmethode eine empfindliche Nachweismethode für den Zustand einer Ghostmembran darstellt.

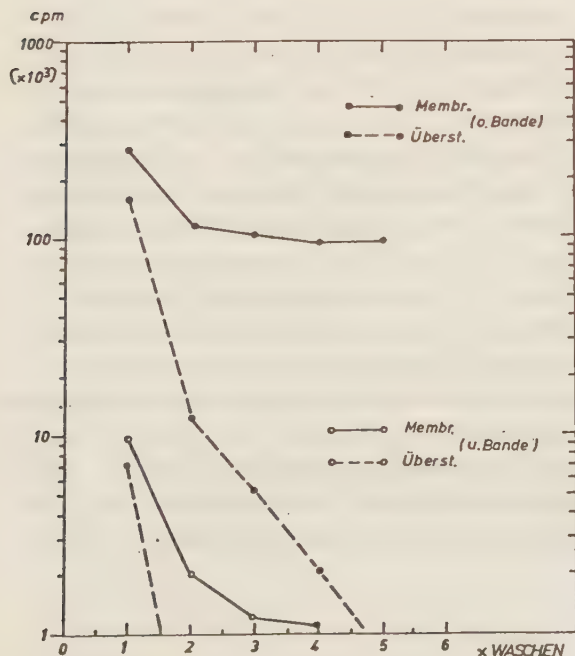


Abb. 13:

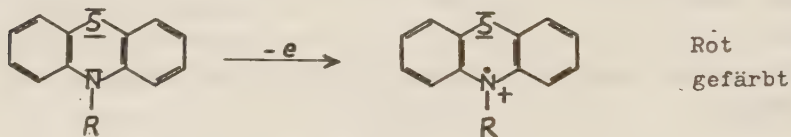
Verhalten der oberen und unteren Bande des Dextranskissens gegenüber ^{14}C -Saccharose

4.2. Quantitative Aussage über den Promethazingehalt der Membranen

4.2.1. Quantitative Promethazinbestimmung

Die Bestimmung des Promethazins erfolgt durch Oxidation mittels FeCl_3 im stark sauren Milieu. Es tritt eine rotgefärbte, positiv einwertige, semichinoide Verbindung auf, die bei 520 nm spektralphotometrisch, gegen gleichbehandelte Ghostmembranen als Blindwert, aber ohne Promethazinzusatz, gemessen wird.

Für den Reaktionsablauf kann man folgendes Schema annehmen (52):



Andere ebenfalls sehr spezifische Bestimmungsmethoden (53), wie cerimetrische oder bromatometrische Titrationen scheiden aus, da der Membran-Promethazinkomplex als Suspension vorliegt und ohnehin extrahiert werden muß. Es war sinnvoll, die bewährte Testmethode nach Krieglstein (35) anzuwenden, und entsprechend zu modifizieren (3.8.). Dieser Test hat jedoch den Nachteil, daß ohne Harnstoffzusatz die Promethazinextraktion nicht quantitativ verlief. Zudem bildeten hohe Proteinkonzentrationen der auszuschüttelnden Proben eine starke Emulsion, die eine exakte Bestimmung verhinderte. Daher wurden die quantitativen Promethazinbestimmungen immer mit Zusatz von 4M Harnstoff (= 2M/ml Testvolumen) und bei einer Proteinkonzentration von 500-1500 µg/ml Testvolumen durchgeführt.

Promethazin-HCl bildete in höheren Konzentrationen als $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ in Phosphatpuffer eine trübe Suspension, die sich aber bei tieferen Temperaturen (5°C), wo die Lösung auch aufbewahrt werden sollte, auflöste.

4.2.2. Promethazingehalt in R.O.- und I.O.-Partikeln

Die mit Promethazin behandelte Ghostsuspension (3.8.2.) wird nach 2 maliger Homogenisation einer elektrophoretischen Trennung unterworfen. Es zeigten sich scharfe Banden bei Fraktionen 32 - 36 (R.O.- Partikel) und 42 - 46 (I.O.- Vesikel). Die gesammelten Prpteinfraktionen werden mit Kammerpuffer gewaschen und auf 2,0 ml aufgefüllt.

Die Konzentrationsbestimmung ergibt für die rechte Bande (I.O.) 6 - 7 Mal höhere Promethazingehalte, bezogen auf mg Protein, als für die linke Bande (Tab. 1).

Diese Tatsache unterstreicht die Vermutung, daß es spezifische Areale auf den Ghostmembranen geben muß, die das Promethazinmolekül binden und dann Endozytose ausführen. Weitere Hinweise auf die Richtigkeit dieser Annahme gibt eine gleichermaßen behandelte Probe, die nicht homogenisiert wird, sondern sogleich nach dem Vesikulier- und Waschschrift in die trägerfreie Elektrophorese eingespritzt wird. In diesem Falle zeigt sich nur eine Bande, die in den Fraktionen 32 - 36 zu finden ist. Da eine Homogenisation nicht durchgeführt wird, bleiben die gebildeten I.O.-Vesikel im Ghostinneren verborgen und tragen somit nicht zu einer Oberflächenladungsänderung bei. Ein elektrophoretischer Trenneffekt unterbleibt. Die spezifischen Promethazingehalte dieses Materials zeigen mit Werten zwischen 6 - 10 (Tab.1) relativ starke Schwankungen. Dies war auf die unterschiedliche Effektivität von Vesikulation und Homogenisation zurückzuführen. Deutlich tritt aber eine starke Erniedrigung des spezifischen Gehaltes auf, der bedingt wird durch sehr hohe Proteinkonzentrationen der größeren R.O.-Partikel, gegenüber den zwar Promethazin enthaltenen, aber wenig zur Proteinmenge beitragenden, kleinen, eingeschlossenen I.O.-Vesikeln.

Vesikuliersuche mit Promethazin	Dextrankissen	trägerfreie Elektrophorese Bandenzahl	spezifische Promethazingehalte mg Prom./mg Protein (x 10 ⁻³)	µMol Prom./mg Prot (x 10 ⁻³)
I.O.-Vesikulierung homogenisiert	—	2	links 3 rechts 20	9,4 62,5
I.O.-Vesikulierung nicht homogenisiert	—	1	links 6 - 10	19 - 31
I.O.-Vesikulierung homogenisiert	obere Bande untere Bande	—	10 (Dialyse) 8,5 (Waschen) 6 (Dialyse) 5,3 (Waschen)	31 26,5 19 16,5
I.O.-Vesikulierung homogenisiert	obere Bande untere Bande	2 2	links 17,5 rechts + links + rechts +	⊖ 55 + +

Tab. 1: Promethazingehalt bezogen auf mg Protein

⊖ nicht mehr meßbar
+ zu wenig Material für reproduzierbare Bestimmung

4.2.3. Promethazingehalte in beiden Banden des Dextrankissens und in beiden Fraktionen der trägerfreien Elektrophorese

Auch nach Auftrennung der mit Promethazin behandelten und dann homogenisierten ghosts in zwei Banden durch Dichtezentrifugation im 3,14%igen Dextrankissen, sollte gezeigt werden, daß das Promethazinmolekül nicht adsorbiert ist, sondern mit der Ghostmembran eine Bindung eingeht (3.8.4.).

Nach fünfmaligem Waschen mit TRA-HAC-Mg⁺⁺-Puffer ergeben sich spezifische Aktivitäten, die für die obere Bande 8,5, für die untere Bande 5,3 betragen. Diese korrelieren gut mit den Dialysewerten: 6,0 für die untere Bande, 10,0 für die obere Bande (Tab.1).

Entgegen den Ergebnissen von Steck(8,37), können nun beide Membranpopulationen des Dextrankissens in der trägerfreien Elektrophorese in R.O.-Partikel (Fraktionen 32 - 36) und I.O.-Vesikel (Fraktionen 42 - 46) aufgetrennt werden (3.8.6.). Die spezifische Aktivität der I.O.-Vesikel der oberen Bande liegt mit 17,5 um ein Vielfaches höher als die der R.O.-Partikel, die aus Gründen der Meßgenauigkeit nicht mehr bestimmt werden konnte, da die Nachweisgrenze fast erreicht war (ca. 1 - 2). Die untere Bande des Dextrankissens ließ sich zwar auch elektrophoretisch auftrennen, eine quantitative Promethazinbestimmung war allerdings wegen zu geringer Materialausbeute nicht möglich.

4.3. Versuche zur Definition der Promethazinbindung

4.3.1. Einfluß der Ionenkonzentration und des Membranzustandes auf die Endozytose

Behandelt man die Ghoststandardsuspension (3.1.1.) mit isotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6 - 8,0, (270 mOsm) und inkubiert

bei 37°C im Verhältnis 1:1 mit Promethazin im gleichen Puffer, so tritt keine I.O.-Vesikulierung ein. Die Membranen zeigen eine stark abweichende Morphologie, die als echinocyte- oder Stechapfel-Form bezeichnet wird. Dies läßt zunächst vermuten, daß Endozytosereaktionen nur unter niederosmotischen Bedingungen und mit "leaky ghosts" durchführbar sind.

Durch Behandlung der Finean ghosts (3.1.2.), die alle geschlossen sind, mit hypotonischem Phosphatpuffer, pH 7,6, läßt sich mit dem Dextranskissen zeigen, daß ca. 70% der Membranen resealed bleiben und die obere Bande bilden (Abb.14). Inkubiert man diese Population, nach Entfernen der Dextranlösung, mit der üblichen Promethazin HCl-Lösung, pH 7,6, bei 37°C, so stellt sich die ursprüngliche Vesikulierung ein.

Dies kann als Beweis gewertet werden, daß das Promethazinmolekül an der Membranaußenseite angreift und nicht erst nach "Einsiegelung" mit der Membran reagiert. Andererseits muß auch festgestellt werden, daß die Osmolarität des verwendeten Puffers eine entscheidende Rolle spielt. Um eindeutige Einstülpungen nach Innen zu erzeugen, sind Milieubedingungen zwischen 16 und 20 mOsm. notwendig.



Abb. 14:

Finean-ghosts, die den hypotonischen Milieubedingungen angepaßt wurden

4.3.2. Stabilisierende Wirkung von Promethazin

Dialysiert man unsealed ghosts (3.1.1.) mit 0,2 mM EDTA, pH 7,5, über 70 Stunden bei 0°C (3.5.3.), so treten neben kleinen Vesikeln viele Membranzerfallsprodukte auf (Abb. 15). Ein analoges Bild erhält man mit der Spektrin Extraktionsmethode von Marchesi (54), der β -Mercaptoäthanol und pH-Bereiche von 7,5-9,5 verwendete, was aber bei den hier beschriebenen Versuchen nicht angewendet werden sollte. Beide Methoden dienen der spezifischen Extraktion des peripheren Proteins im niederionigem Milieu.

Unterwirft man unsealed ghosts einer Dialyse gegen 0,2 mM EDTA + 10^{-3} M Promethazin HCl, pH 7,5, (3.5.4.), so sind nach 70 Stunden keine morphologischen Änderungen in der Membranamorphologie feststellbar (Abb. 16). Die ghosts haben zum überwiegenden Teil kugelförmiges Aussehen und sind im Durchmesser etwas kleiner, als unsealed ghosts. Es sind deutlich einige Lipidpunkte an der Membran zu erkennen. Auch nach Wärmebehandlung bei 37°C über mehrere Stunden ist keine Strukturänderung feststellbar, vielmehr tritt zunehmende Glättung der Membran und Fixierung der Kugelgestalt ein (Abb. 16a).

Eine I.O.-Vesikulierung nach erneutem Promethazinzusatz 10^{-3} M zum Retentat (1:1) tritt nicht ein.

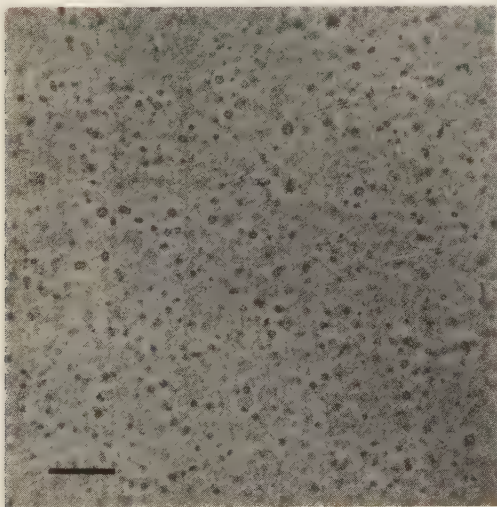


Abb. 15:

Zustand der Membranen
nach Dialyse unter nie-
derionigen Milieubedin-
gungen

(Balken = 10 μ m)

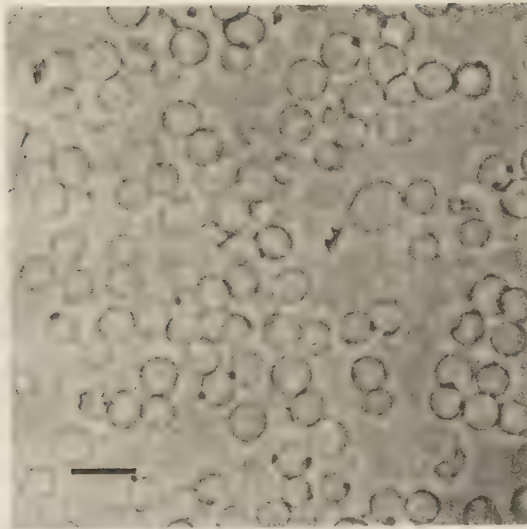


Abb. 16: Zustand der Ghostmembranen nach 70-stündiger Dialyse gegen 0,2 mM EDTA + Promethazinzusatz (Balken = 10 μm)

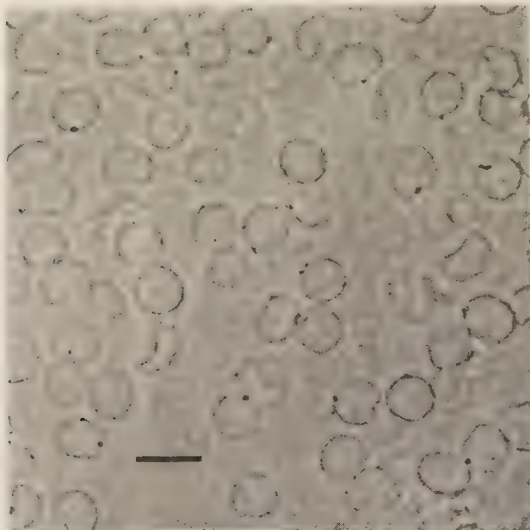


Abb. 16a: Dialysierte ghosts der Abb. 16 nach 2-stündiger Behandlung bei 37°C (Balken = 10 μm)

Durch Inkubation von 200 μ l Phospholipase C mit 1 ml Ghost-standardsuspension bei 37°C (3.5.2.) sind ähnliche Erscheinungsformen im Phasenkontrastmikroskop wie in Abb. 16a zu beobachten. Es treten nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten kleine kontrastreiche Lipidpunkte an den Membranen auf (Abb. 17); ein Zerfall wie im Kontrollpräparat ohne Phospholipase C findet ebenso wenig statt, wie eine Vesikulierung bei gleichzeitigem Promethazinzusatz.

Somit liegt der Schluß nahe, daß eine I.O.-Vesikulierung in direktem Zusammenhang mit der Lipidstruktur und dem peripheren Protein Spektrin stehen muß.

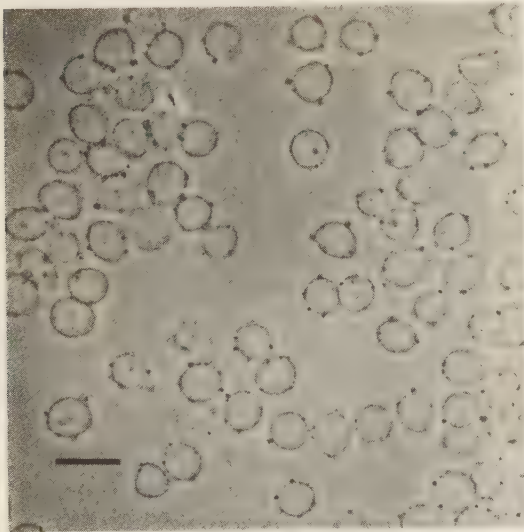


Abb. 17: Phospholipase C behandelte ghosts nach 30-minütiger Inkubationsdauer (37°C), mit und ohne Promethazinzusatz (Balken = 10 μ m)

4.3.3. Charakterisierung (Überstand und Membranen) nach Dialyse im niederionischen Puffer (in Abwesenheit und Gegenwart von Promethazin)

Durch vergleichende SDS-Gelelektrophorese der Dialysate und Retentate (3.5.3. und 3.5.4.), soll gezeigt werden, daß gravierende Unterschiede im Proteinmuster bestehen, wenn Promethazin bei der Dialyse ab- oder anwesend ist. Während nach der Behandlungsmethode von Ralston (28), neben anderen extrahierten Proteinen, sehr viel Spektrin im Überstand zu finden ist (Abb. 18a), wird bei den mit EDTA-Promethazin dialysierten Membranen sehr wenig von diesem Dimeren (MG: 255 000 und 220 000) abgespalten (Abb. 18b).

Das Proteinmuster der Retentate (mit und ohne Promethazinzusatz) verhält sich bis auf kleine Verschiebungen im niedermolekularen Bereich identisch; ebenso sind keine Unterschiede zu den unbehandelten Ghostmembranen feststellbar (Abb. 18c-e).

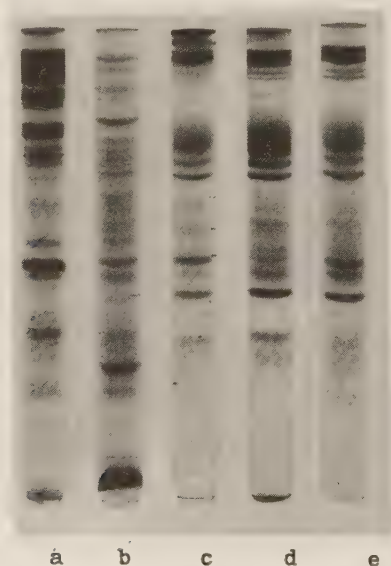


Abb. 18: 7,5%-ige SDS-Gele: a = Dialysat EDTA; b = Dialysat EDTA + Prom.; c = Retentat EDTA + Prom.; d = Retentat EDTA; e = unbehandelte ghosts; Auftragsmenge 100 µg/Gel

4.3.4. Sättigungskurve

Versetzt man die Ghostmembranen mit Promethazinkonzentrationen von 15 - 30 mg%, trennt durch Dichte zentrifugation in 2 Banden auf und bestimmt nach 2 - 3 maligem Waschen mit Kammerpuffer, pH 7,4, in der oberen Bande die jeweiligen Extinktionen (3.8.), so ergibt sich bei Auftragen der spezifischen Aktivität (Ordinate) gegen die eingesetzten Konzentrationen (Abszisse), ein Kurvenverlauf, der dem einer Enzym-Substratsättigung ähnelt. Die Kurve steigt bis 15 mg% ($4,6 \times 10^{-4}M$) relativ linear an, neigt sich dann aber einem Sättigungsplateau (Abb. 19). Hierin verhält sich auch die untere Bande, abgesehen von den Fehlern, die auf die geringen Materialmengen zurückzuführen sind, analog.

Das Ergebnis des Kurvenverlaufes steht in Einklang mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen. Bis Konzentrationen von 15 mg% läuft die "Vesikulierung" unkontrolliert ab, es treten u.a. Exozytose und Membranbruchstücke auf (Zerfall). Erst im Plateaubereich findet man gerichtete Endozytose mit stärkster I.O.-Vesikelbildung. Dies Verhalten entspricht den von Leutner (7) ermittelten optimalen Konzentrationen zur Vesikulierung von $c = 5 \times 10^{-4}$ bis $2 \times 10^{-3}M$ für Primaquine und Promethazin.

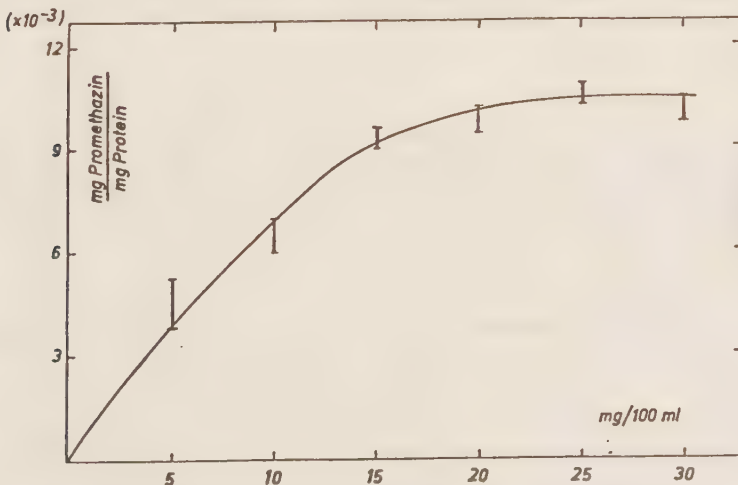


Abb. 19: Sättigungskurve der Banden des Dextranskissens

Die in Abb. 19 gezeigte Sättigungskurve erhält man durch Extraktion des Promethazins nach 4M Harnstoffzusatz. Unterläßt man die Behandlung des Membran-Promethazinkomplexes mit chaotropen Agentien, so ändert sich der Sättigungsverlauf entsprechend Abb. 20, was auf eine starke Beteiligung einer hydrophoben Bindung bzw. Wechselwirkung schließen läßt (38). Um zu ermitteln, ob und inwieweit ionische Interaktionen eine Rolle spielen, gibt man dem Vesikuliermedium 0,04 M NaCl hinzu, wäscht mit hypotonischem Phosphatpuffer und halbiert die Probe. Zur ersten Hälfte inkubiert man nochmals Promethazinslösung (ohne NaCl), während der andere Teil parallel mit hypotonischem Puffer weiter behandelt wird (3.9.2.) nach 60 Minuten werden deutliche Unterschiede im Vesikulierverhalten lichtmikroskopisch sichtbar. Während die ghosts des ersten Teiles eine volle Vesikulierbereitschaft entwickeln, zeigt die nur mit Puffer versetzte Probe keine bzw. sehr wenig Vesikel; ihre spezifische Aktivität beträgt 3 - 4,5.

Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß sowohl hydrophobe als auch ionische Bindungen an der Endozytosereaktion beteiligt sein müssen.

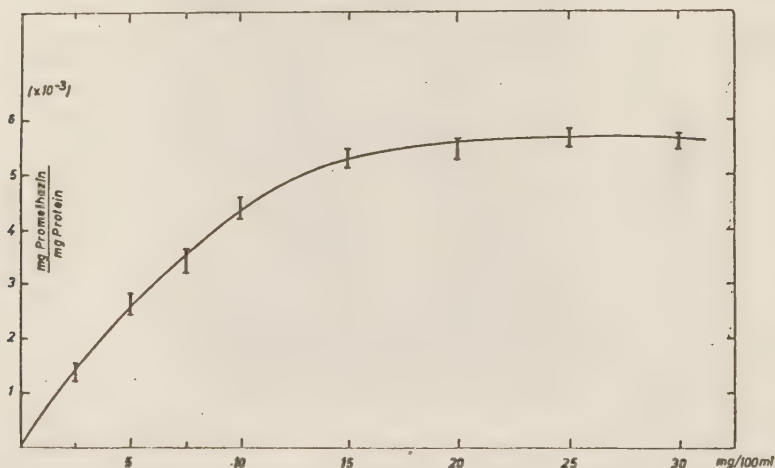


Abb. 20: Extraktion des Promethazins ohne Harnstoffzusatz

Daß gerade 0,04M NaCl zum Vesikuliermedium hinzugegeben werden mußte, kann man durch Waschen der erfolgreich vesikulierten Membranen mit steigenden Salzkonzentrationen (0,01-0,1 M NaCl) zeigen (3.9.2.). Nach Auftragen der Molarität bzw. Leitfähigkeit (Abszisse) gegen den spezifischen Promethazingehalt (Ordinate) zeigt sich zwischen 0,03M und 0,04M NaCl ein starkes Absinken der spezifischen Aktivität von 8 auf 5; ein Wert, der auch nach Waschen mit höheren Salzkonzentrationen als 0,04M konstant bleibt (Abb. 21).

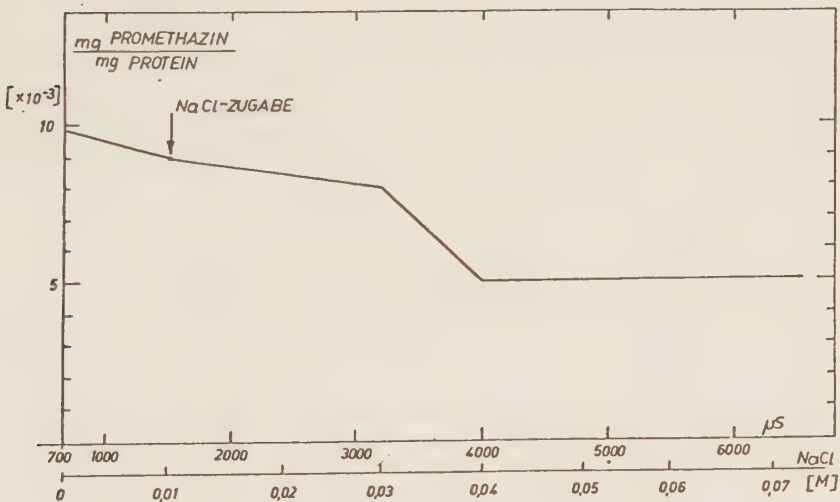


Abb. 21: Absinken des spezifischen Promethazingehaltes nach 0,04 M NaCl-Zusatz

4.3.5. Scatchard-plot

Kurvendiagramme nach Scatchard (55) erlauben Aussagen über Anzahl von Bindungsstellen, Bindungskonstanten und die Festigkeit einer Bindung. Da nach 3.9.5. der Membran-Promethazinkomplex nicht dialysiert vorlag, kann nur auf Grund des gezeigten Kurvenverlaufes auf zwei unterschiedliche Bindungsaffinitäten geschlossen werden. Da Ghostmembranen kein definiertes Molekulargewicht aufweisen, wurden die ermittelten Promethazinwerte für gebundenes (c_b) und freies (c_f) Material auf mg Protein bezogen (56).

Bindungsstellen und Bindungskonstanten können aber nur bestimmt werden, wenn eine ganz definierte Bindung (kovalent, ionisch) vorliegt. Bei hydrophoben Bindungen muß man diese Bindungsart unter unspezifische Bindungen klassieren, bei denen keine echten Bindungskonstanten ermittelt werden können. Ebenfalls lag in vorliegender Bestimmung der Membran-Promethazinkomplex nicht völlig frei von ungebundenem Promethazin vor (3.9.5.). Der erhaltene Scatchard-plot läßt also nur zu, auf eine feste und eine lockere Bindungsart des Promethazinmoleküles an die Membran zu schließen.

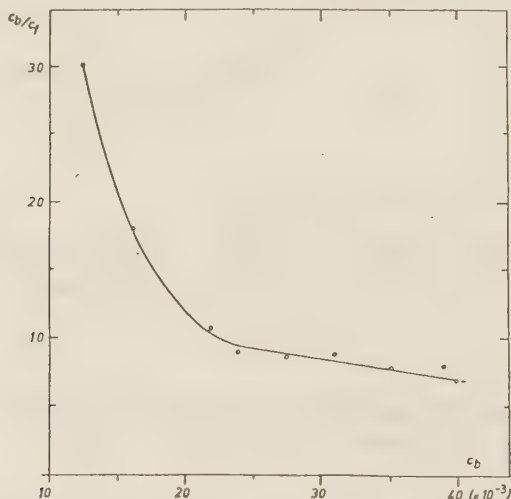


Abb. 22: Modifiziertes Scatchard-plot; Konzentrationsangabe des gebundenen (c_b) und freien (c_f) Promethazin: $\frac{\text{mg Promethazin}}{\text{mg Protein}}$

4.4. Versuche mit radioaktivem Promethazin zur Lokalisierung

4.4.1. DC-Reinigung des tritiierten Promethazins

Von der tritiierten, verunreinigten Substanz (Buchler, Amersham) wurden 100 mg in ca. 0,5 ml bidest. Wasser gelöst und auf eine präparative Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator aufgetragen. Die Platte wird sodann in Chloroform: Methanol (65:35) chromatographiert, danach unter einer UV-Lampe detektiert. Es zeigten sich bei der katalytisch tritiierten Substanz durch Fluoreszenzlöschung 4 deutliche Flecken. Das ^3H -Promethazin wies den gleichen R_f -Wert (0,52) wie die Reinsubstanz auf (Abb.23). Bei der schnell wandernden Komponente muß es sich um das rotgefärbte, semichinoide Derivat, entstanden durch Radiolyse handeln. Es ist identisch mit dem R_f -Wert des rotgefärbten Produktes, das bei 6-stündiger UV-Bestrahlung der Promethazinslösung entsteht.

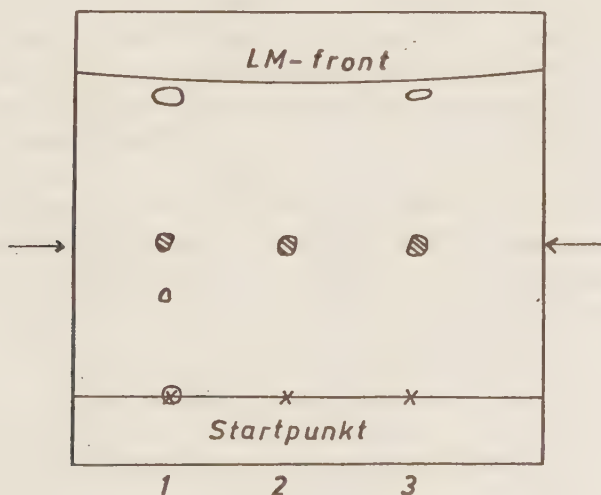


Abb. 23: 1 = ^3H tritiierte Substanz; 2 = Promethazin-HCl;
3 = 6 Stunden UV-bestrahltes Promethazin-HCl

4.4.2. Elektrophoretische Nachreinigung der ^3H -Stammlösung zur Darstellung einer Tracerlösung

Die DC-gereinigte Stammlösung (20 mg/25 ml = 1 mCi/25 ml) wurde in der trägerfreien Elektrophorese nochmals auf Reinheit geprüft. Die ^3H -Aktivitätsbestimmung aller 92 Fraktionen ergab einen Gipfel im Kathodenbereich (Fraktionen 83 - 91) mit einem kleinen Vorpeak bei Fraktion 65 - 75 (Abb. 24). Dieses elektrophoretische Verfahren wurde auch auf kaltes Promethazin (2 ml einer $2 \times 10^{-3}\text{M}$ Lösung) angewendet. Durch Extinktionsmessung bei 248 nm ergibt sich ein Gipfel bei den Fraktionen 85 - 90 (Abb. 24a). Die Ausbeute lag bei 92% (1,19 mg). Damit war bewiesen, daß das Promethazinmolekül in der trägerfreien Elektrophorese zur Kathode wandert und das reine ^3H -Promethazin also im Hauptgipfel zu finden ist.

Nur mit diesem hochgereinigtem radioaktivem Material wurden die elektrophoretischen und autoradiographischen Versuche zur Membranlokalisierung durchgeführt. Um aber nicht mit hochaktivem Material arbeiten zu müssen, wird eine ^3H -Tracerlösung hergestellt. Eine Konzentrationsbestimmung der gefriergetrockneten "heißen" Fraktionen des Kathodengipfels bei 248 nm ergab einen Gehalt von 1,8 mg. Durch Szintillationszählung wurden $140 \times 10^6 \text{ cpm}$ festgestellt. Ergänzt wurde zu 10^{-3}M mit 30,4 mg kaltem Promethazin-HCl und mit Phosphatpuffer, pH 7,6, zu 100 ml aufgefüllt. Diese Tracerlösung hat in 100 ml (32,2 mg) $140 \times 10^6 \text{ cpm}$, d.h., $140 \mu\text{Ci}/1000 \mu\text{Mol}$. Die spezifische Radioaktivität ist also $0,14 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$.

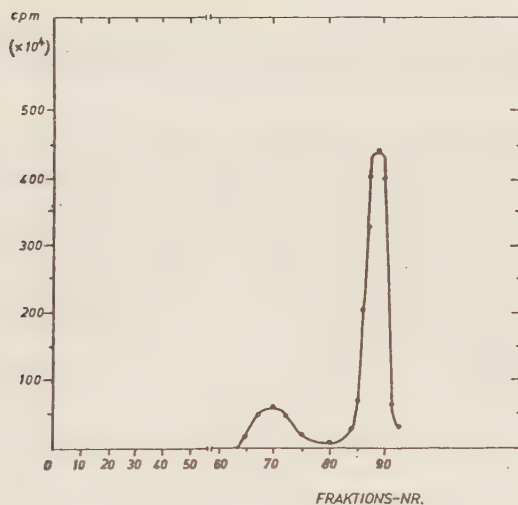


Abb. 24: Elektrophoretische Nachreinigung der ^3H -Promethazin Stammlösung

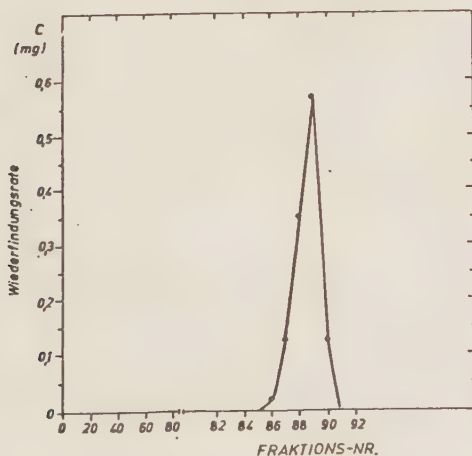


Abb. 24a: Ermittlung der elektrophoretischen Ablenkung des "kalten" Promethazins

4.4.3. Elektrophorese ^3H -Promethazin-behandelter Membranfraktionen

Durch Inkubation der Ghoststandardsuspension mit der ^3H -Tracer-Lösung, anschließendes Homogenisieren und elektrophoretischer Trennung, ergibt sich ein Trennprofil, das die Überlagerung von ^3H -Aktivität mit den Proteinfractionen der R.O.-Partikel (32 - 36) und den I.O.-Vesikeln (42 - 46) zeigt (Abb.25). Das ungebundene ^3H -Promethazin ist in den Fraktionen 85 - 90, also an der Kathode zu finden.

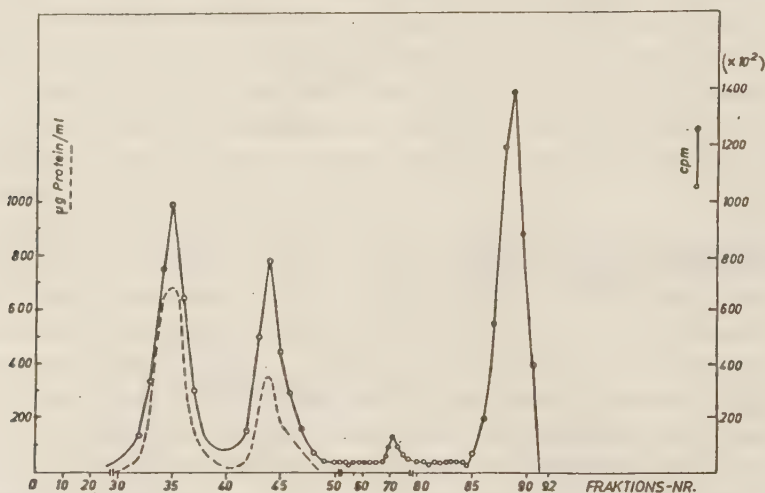


Abb. 25: Überlagerung der ^3H -Aktivität mit Proteinfractionen der rechten(I.O.) und linken(R.O.) Bande

Damit wird gezeigt, daß der Membran-Promethazinkomplex im elektrischen Feld erhalten bleibt. Es ist zu erkennen (Abb.25), daß der spezifische Promethazingehalt in der rechten Proteinbande (I.O.-Vesikel) mit 240×10^3 cpm/mg Protein höher ist als in der linken Bande (140×10^3 cpm/mg Protein). Diese relativ hohe Aktivität der linken Bande kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß sich in dieser Population noch eine beachtliche Anzahl unhomogenisierter, eingeschlossener I.O.-Vesikel befindet. Dieser Wert schwankt von Präparation zu Präparation sehr (s.Tab. 1).

4.4.4. Elektronenmikroskopische Autoradiographie

Zur Autoradiographie wurden neben I.O.-Vesikeln und R.O.-Partikeln aus der elektrophoretischen Trennung auch ghosts nach abgeschlossener Endozytose verwendet. Durch mehrmaliges Waschen befreite man diese unbehandelten, aber vesikulierten ghosts von überschüssigem ^3H -Promethazin und unterwarf sie dem Einbettungsverfahren (3.11.2.). Durch Zugabe von PPO als Szintillator zum Harz waren in den 800 Å Schnitten nur Expositionszeiten von lediglich 25 - 30 Tagen bis zur vollständigen Ausbildung der Silberfäden notwendig (45). In Abb. 26 sind die vesikulierten (90 Minuten) und homogenisierten Ghostmembranen gezeigt. Es befindet sich aktives ^3H -Promethazin-HCl sowohl an den I.O.-Vesikeln als auch an den R.O.-Partikeln. Analoges Bild erhalten wir durch Autoradiogramme der elektrophoretisch aufgetrennten Membranpopulationen.

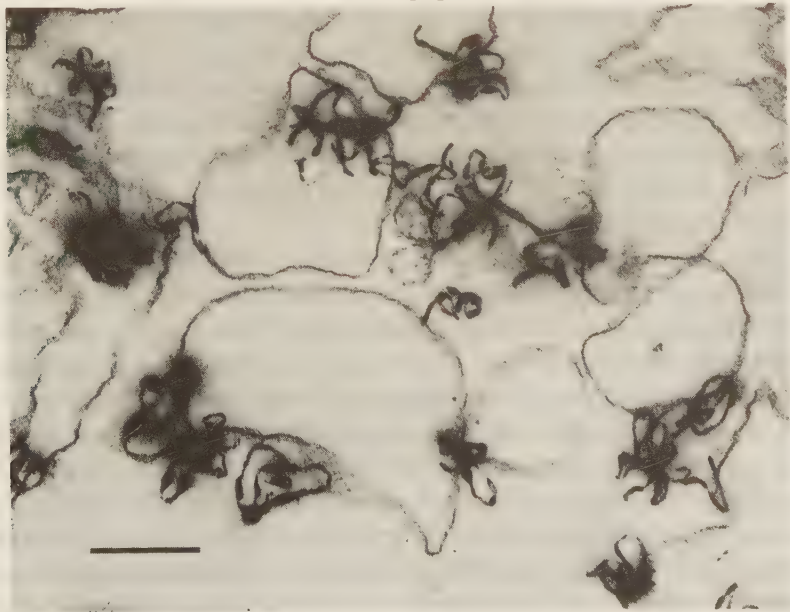


Abb. 26: Elektronenmikroskopisches Autoradiogramm einer ^3H -Promethazininlösung mit Erythrozytenghosts; Expositionszeit: 30 Tage (Balken = 0,5 μm)

5. Diskussion =====

5.1. Charakterisierung der Membranpopulationen

Es werden in der Literatur verschiedene Hämolysemethoden für Erythrozyten im hypotonischem Puffermilieu diskutiert, die zu hämoglobinfreien ("white") oder zu hämoglobinhaltigen ("pink") ghosts führen. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Methoden besteht in der Art der Hämolyse, was Zeitdauer und Puffermilieu anbelangt. Passow (57) erhöht nach 5 Minuten Hämolysezeitdauer bei 0°C die Osmolarität durch Salzzugabe von 40 mOsm auf isotone Bedingungen ("Reversion"), und erhält Ghostmembranen, die noch Hämoglobin und intrazelluläre Verunreinigungen aufweisen ("pink ghosts"). Die sogenannten "white ghosts" verbleiben auch nach 20-minütiger Hämolyse im hypotonischen Puffermilieu und sind optisch vollkommen frei von Hämoglobin. Da Bindungen des Hämoglobins mit wichtigen Membranproteinen vermutet wurden (58), könnten durch seine vollständige Entfernung enzymatische Aktivitätsverluste, Permeabilitätsänderungen und Membranfragmentierungen eintreten (11). Finean schlägt deshalb eine Glycerin induzierte Hämolyse unter isoionischen Bedingungen vor, die ebenfalls hämoglobinfreie ghosts liefert (11).

Weißer ghosts, hergestellt im hypotonen Puffermilieu, dienen jedoch seit langem als Grundlage für Studien über enzymatische und morphologische Membraneigenschaften, sowie zum Studium der Bausteine der Membran (59,60,61,62). Es wird nämlich zunehmend die Meinung vertreten, daß Hämoglobin nur in lockerer Form an die Membran gebunden ist und durch seine Entfernung keine wichtigen Strukturproteine mit entfernt werden. Neuere Versuche (58) beweisen, daß erst bei zweiwöchiger Aufbewahrung im hypotonischen Puffer ca. 70% Spektrin und Actin extrahiert werden. Heidrich et al. (5) konnten unter reproduzierbaren Arbeitsbedingungen zeigen, daß ghosts, hergestellt im 0,005M Phosphatpuffer, intak-

te Enzymsysteme (Acetylcholinesterase, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, NADH/H^+ Cytochrom- "c" Oxidoreduktase) aufweisen, die auch bei weiteren Aufarbeitungsschritten nicht geschädigt werden. Speziell Acetylcholinesterase wird allgemein als Indikator für eine intakte Erythrozytenmembran angesehen (23,63).

In der vorliegenden Arbeit sollten weiße Erythrozytenghosts verwendet werden. Dies war notwendig, da (unkontrollierbares) Resthämoglobin jede quantitative Proteinbestimmung gestört hätte, ferner, da das Hämoglobin evtl. die Endozytose beeinflusst hätte. Auch wäre die morphologische Aussagekraft über die Membranvesikelpopulationen erschwert worden. Nach den im Vorhergehenden und auch im Folgenden diskutierten Ergebnissen aus den Untersuchungen der hergestellten weißen ghosts, konnten diese für das Studium des Endozytosemechanismus auch ohne weiteres verwendet werden.

Transportstudien an der Erythrozytenmembran setzen eine Wiederherstellung des semipermeablen Zustandes der Membran auch für kleine Ionen voraus, der nach Passow (57) nur mit "resealed pink ghosts" zu erreichen ist. Nach der "Reversion" werden nach Passow die pink ghosts einer ca. 1-stündigen Wärmebehandlung (37°C) unterworfen, wodurch sich die Membranen schließen ("resealing"). Durch Einbauversuche mit ^{86}Rb konnte gezeigt werden, daß die Wiederherstellung der Semipermeabilität allerdings nicht quantitativ verläuft; es traten 3 Ghosttypen auf, die auf einem Zuckerkissen getrennt wurden. So sollen ghosts (Typ I) existieren, die bereits nach der Hämolyse, andere erst nach der "Reversion" (Typ II) undurchlässig für Protein und Alkali werden. Unerklärlich bleibt der relativ hohe Anteil von leaky ghosts (Typ III), der nur durch veränderte Hämolysebedingungen und nicht durch verlängerte Wärmebehandlung beeinflusst werden kann.

Resealing ist auch ein temperaturabhängiger Vorgang, der bei 37°C in verstärktem Maße einsetzt, bei 20°C aber bereits von einer starken lag-Phase begleitet wird. Noch entschiedener als Passow (9), vertritt Johnson (10) die Ansicht, daß zur Wiedererlangung der Semipermeabilität neben dem Temperaturparameter zusätzlich eine bestimmte Ionenstärke erforderlich sei; niedrigere Ionenstärken als 35 mOsm. sollen Resealing verhindern. Letztere Aussage steht allerdings im Widerspruch zu den von anderen Autoren (8,5) und zu einigen in dieser vorliegenden Arbeit gefundenen Daten. So sind Ghostmembranen, hergestellt in niederionigem Puffer (20 mOsm.), zumindest für Dextran T110 undurchlässig. Versuch (4.1.6.1.) zeigt, daß durch Temperaturerhöhung des Inkubationsmediums auf 37°C und anschließender Zentrifugation, auf dem Dextrankissen zwei scharfe Banden auftreten, wovon die Membranen der oberen für Dextran "dicht" sind und auf dem Kissen schwimmen, während die der unteren Bande mit Dextranlösung equilibrieren, schwerer werden, und auf den Boden des Zentrifugenröhrchens wandern (leaky ghosts). Ähnliche Ergebnisse erhält man auch mit 31,7%iger Saccharoselösung als Dichtekissen. (Diese Versuche sind in der vorliegenden Arbeit aber nicht beschrieben, da sie von leichten Schmiereffekten zwischen beiden Banden begleitet und daher nicht eindeutig reproduzierbar waren). Daß die Partikel der oberen Bande tatsächlich auch für Saccharose geschlossen sind, beweist die Zugabe von ^{14}C -Saccharose vor Temperaturerhöhung auf 37°C. Während in der unteren Bande nur noch sehr wenig Aktivität zu finden ist, weisen die geschlossen (resealed) Membranen der oberen Bande eine beträchtliche ^{14}C -Aktivität auf (4.1.6.5.). Definiert man wie Johnson (10) das Sich-Schließen der Membran als Wiederherstellung der Semipermeabilität nur gegenüber Makromolekülen, so muß dies nach den vorliegenden Ergebnissen auch für hypoton behandelte ghosts im Phosphatpuffer (20 mOsm) mit anschließender Promethazin-Temperaturbehandlung postuliert werden. Umstritten bleibt weiterhin die Frage der Semipermeabi-

lität dieser ghosts gegenüber Alkaliionen, deren Lösung allerdings umfangreiche Transportstudien voraussetzen würden. Es wäre denkbar, daß ein Teil der weißen resealed ghosts durch den osmotischen Stress einen Abbau der Ionenpumpen erfahren hat und daher der nach Passow geforderten Transportkinetik für Alkaliionen nicht mehr gehorcht.

Es konnte gezeigt werden (4.1.6.1.), daß das Resealing bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten ghosts sehr schnell verläuft; bereits nach 15 minütiger Temperatureinwirkung (37°C) sind die Membranen für Dextran impermeabel und bilden die obere Bande des Dextrankissens. Die untere Bande kann somit als ein Folgeprodukt der Homogenisation angesehen werden; durch Scherkräfte werden Membranen z.T. wieder geöffnet, bzw. Fragmente gebildet. Da stets ein gewisser Vesikulierungsgrad bei allen beschriebenen Versuchen notwendig war, konnte eine Zeitabhängigkeit des Resealing nicht ermittelt werden. Es muß aber vermutet werden, daß hypoton behandelte ghosts sich spontan schließen. Diese Tatsache würde mit den Aussagen von Finean (11) übereinstimmen, der allerdings mit glycerinhaltigem, isoionischem Hepespuffer hämoglobinfreie ghosts darstellt. Da diese ghosts keinem osmotischen Schock ausgesetzt werden, ist ihre Darstellungsweise schonender. Diese Membranen sollen auch gegenüber kleineren Molekülen geschlossen sein, und stellen eine gute Alternative zu hypoton behandelten ghosts dar, bei denen ein Nachweis für diese Molekülgruppe nicht geführt wurde. Es ist allerdings auch noch nicht bewiesen, ob das Glycerin bei der Hämolyse nicht doch die echte Permeabilität für kleine Ionen stört.

Nachdem aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen geschlossen werden muß, daß die mit hypotonem Phosphatpuffer, Promethazin und Temperatur gewonnenen ghosts und Vesikel

zum größten Teil für Moleküle - zumindest für Moleküle > Saccharose - dicht sind, konnte durch vergleichende SDS-Gelelektrophorese auch gezeigt werden, daß weder die geschlossenen noch die offenen Membranpartikel während der Behandlung (Temperatur, Homogenisation, Dextrankissen), Proteinverluste erleiden.

Während die Proteinmuster mit dem der Ghoststandardsuspension identisch sind (4.1.6.2.), kann beim Vergleich des Lipid/Proteinverhältnisses eine leichte Erhöhung der unteren Bande festgestellt werden (4.1.6.3.). Diese Abweichung ist aber nicht gravierend; sie bestätigt vielmehr die Trennleistung des Dextrankissens nach "leaky-resealed", die demnach nicht auf Dichteunterschieden beruhen kann. Einheitlich verhält sich auch das Proteinmuster der R.O.- und I.O.-Partikel, die durch Moleküle, wie Vitamin A, Primaquine oder Promethazin bewirkt werden (7). Die verwendeten Präparationsmethoden sind nach diesen Resultaten geeignet, unveränderte Erythrozytenmembranen und Vesikel zu liefern. Als ideale Trennmethode dieser Membranpopulationen erweist sich die trägerfreie Elektrophorese nach Hannig (17). Auf Grund des 6 Mal höheren Neuraminsäuregehaltes der R.O.-Partikel gegenüber den I.O.-Vesikeln, ergeben sich im elektrischen Feld unterschiedliche Migrationswege, so daß zwei deutlich getrennte Banden auftreten. Dies beweist, daß allein der Ladungsunterschied und nicht wie Steck (8,37) behauptet, die unterschiedliche Dichte für den Trenneffekt bei der Populationen maßgebend ist.

5.2. Interaktionen des Promethazinmoleküles mit der Ghostmembran

Die Gründe, die unter Beteiligung polarer Agentien ("Cupformer"), wie Vitamin A, Primaquine oder Promethazin (5,15,23) zu einer Endozytosereaktion führen, sind schwer erkennbar. Da bei dieser Reaktion auch ein niederioniges Puffermilieu eine Rolle spielt, ist es zudem schwierig zu sagen, welche Rangstellung und Bedeutung diesen niederionigen Pufferkonzentrationen zugemessen werden muß, da einige Autoren nur in einem solchen Milieu Vesikel darstellen (8,64). Von ihnen kann die Meinung vertreten werden, daß die "Cupformer-Moleküle" im Zuge der durch hypotonische Puffer ausgelösten Endozytosereaktionen in das Membraninnere eingesiegelt werden und nur eine untergeordnete Rolle spielen könnten. Nach den vorliegenden Untersuchungen ist das aber nicht so.

Durch Trennung des ^3H -aktiven Membran-Promethazinkomplexes im elektrischen Feld kann Aktivität sowohl an den R.O.- als auch den I.O.-Partikeln nachgewiesen werden (4.4.3.). Hier schon deutet sich an, daß das Molekül niemals nur adsorbiert, sondern gebunden sein muß. Um den adsorptiven Effekt gänzlich ausschließen zu können, wurden die auf dem Dextranskissen getrennten Membranen mehrmals gewaschen bzw. 24 Stunden dialysiert, wobei die durch verschiedene Methoden ermittelten Werte miteinander übereinstimmten (Tab.1). Damit liegen einmal Partikel vor, die gebundenes und kein überschüssiges Material mehr enthalten, zum anderen ist ein positiver Promethazinnachweis in der unteren Bande der beste Beweis gegen eine bloße Einsiegelung des Moleküls. Die Membranen der unteren Bande können an sogenannten Einsiegelungen gar nicht beteiligt sein, da das Trennkriterium allein auf dem Membranzustand ("leaky-resealed") beruht, was durch eine rapide Abnahme der ^{14}C -Saccharose Aktivität in der unteren Bande auch nachgewiesen werden konnte (4.1.6.5.). Ferner kann

mit geschlossenen Finean ghosts uneingeschränkte I.O.-Vesikulierung erzeugt werden, nachdem diese Membranen den hypotonen Bedingungen von 16 - 20 mOsm. angepaßt waren (4.3.1.).

Elektrophoretische Trennversuche zeigen, daß I.O.-Vesikel einen ca. 6 - 7 Mal höheren Promethazingehalt als R.O.-Partikel aufweisen. Da gezeigt wurde, daß das Promethazinmolekül an der Membran gebunden ist, muß vermutet werden, daß es spezifische Membranareale gibt, die in verstärktem Maße Bindungen mit Promethazinmolekülen eingehen, bevor sie sich endozytotisch einstülpen; was wiederum gegen eine bloße Einsiegelung des Moleküles spricht. Verglichen mit den riesigen Membranoberflächen der R.O.-Partikel, tragen die kleinen I.O.-Vesikel durch ihre verstärkte Bindungskapazität für das Promethazinmolekül zu hohen Promethazinaktivitäten, bezogen auf mg Protein, bei (Tab. 1). In vorliegender Arbeit werden durch einen modifizierten Scatchard plot (56) für Promethazin zwei unterschiedliche Bindungsarten mit der Membran gefunden (4.3.5.), wobei allerdings über ihre Bindungskonstanten keine Angaben gemacht werden können. Auch Elferink (65) beschreibt für Chlorpromazin zwei Bindungsstellen mit der Ghostmembran: Einer starken Bindung an der Membraninnenseite steht eine schwache Bindung an der Membranaußenseite gegenüber.

Mit Sicherheit auszuschließen ist eine kovalente Bindung des Promethazins an die Membran, nachdem sich in der autoradiographischen SDS-Gelelektrophorese mit ^3H -Promethazin keine aktive(n) Bande(n) zeige(n). Da eine vollständige Extraktion des Promethazins aus der Membran nach den vorliegenden Ergebnissen nur mittels 4M Harnstoff möglich ist (4.3.4.), muß die starke Beteiligung einer hydrophoben Bindung vermutet werden (38). Zusätzlich müssen ionische Interaktionen zwischen Membran und elektrophiler Seitenkette in die Überlegung mit einbezogen werden. Abb. 21 zeigt zwischen 0,03M und 0,04M NaCl-Zugabe einen Abfall des spezifischen Promethazingehaltes, was auf eine schwache Ionenbindung hindeutet. Für kontrollierte Endozytosereak-

tionen scheint aber ein NaCl- (allgemein: Salz-) armes Milieu wichtig zu sein, da bei NaCl-Gegenwart (0,04M) auch nach 60 minütiger Temperatureinwirkung (37°C) keine Einstülpungen auftreten. Diese entfalteten sich erst wieder nach Freiwaschen der Bindungsstellen und Nachinkubation mit Promethazin (4.3.4.). Es mußten hypotone Milieubedingungen von 16 - 20 mOsm vorliegen. Dann auch, nach Anpassung an niedrigere Ionenstärken, bildeten geschlossene, isotonisch hergestellte Finean ghosts mit Promethazin I.O.-Vesikel. Im Gegensatz zu diesen kontrollierten Endozytosereaktionen, verlaufen Endozytosereaktionen, die ohne Drogenzusatz nur in niederionigem Puffermilieu ausgeführt werden (8), spontan und ungerichtet (Membranzerfall). Lutz (66) führt dies auf gestörte Interaktionen von Spektrin mit integrierten Proteinen zurück. Durch Zusatz von Promethazin erreicht man eine kontrolliert ablaufende Endozytosereaktion, die erst nach 45 - 60 Minuten beendet ist. Man kann deshalb nicht wie Penniston (23) von einer durch Drogen induzierten Endozytose sprechen, sondern muß eine stabilisierte, durch das Puffermilieu unterstützte, I.O.-Vesikulierung postulieren. Es kann nämlich gezeigt werden, daß Promethazin den Abbau wichtiger Membranstrukturproteine verhindert. Dialysiert man Ghostmembranen gegen 0,2 mM EDTA, so ist nach 70 Stunden sehr viel Spektrin aus der Membran extrahiert worden (Abb.18); im Phasenkontrastmikroskop sind neben kleinen Vesikeln viele Membranfragmente zu sehen (Abb.15). Dies ist ein typischer unkontrollierter Zerfall der Membran mit anschließender Vesikulierung. Gibt man zur EDTA-Lösung jedoch Promethazin (10^{-3} M) hinzu, so verlieren die Membranen nach 70 Stunden nur sehr wenig Spektrin (Abb.18). Im Mikroskop ist keine Vesikelbildung zu erkennen; die Ghostmembranen behalten vielmehr ihre ursprüngliche Form bei (Abb.16). Auch nach Temperaturerhöhung dieser ghosts auf 37°C ist keine morphologische Änderung der Membranarchitektur feststellbar, die ghosts werden lediglich etwas kleiner im Durchmesser und nehmen z.T. Kugelgestalt an (Abb.16a). Diese Beobachtungen ste-

hen im Einklang mit anderen Autoren (67,68,69), die Spektrin für Membrandeformationen verantwortlich machen. Man muß zu dem Schluß kommen, daß Vesikelbildung durch Zerfall in I.O.- und R.O.-Vesikel in niederionigem Milieu (<15 mOsm.) generell die Folge von Spektrinverlusten der Ghostmembran ist, während bei der kontrollierten Vesikeldarstellung mit Promethazin die Vesikulierung gezielt an mehreren Stellen der Membran nur nach Innen und ohne nennenswerten Spektrinverlust abläuft. Leutner (7) konnte dies bereits durch SDS-Gelelektrophorese andeuten, wo er identische Proteinmuster für I.O.- und R.O.-Partikel fand, d.h., auch zeigen konnte, daß die Spektringehalte in etwa identisch sind.

5.3. Mechanismus

Für den Mechanismus der Endozytosereaktionen (Pinozytose und Phagozytose) werden in der Literatur zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So sind einige Autoren (12,70,71) der Auffassung, daß die Vesikelbildung energieabhängig ist, wobei das von Außen zugeführte ATP von den in der Ghostmembran liegenden ATP-asen hydrolysiert werden soll. Diese These wird dadurch gestärkt, daß Natriumfluorid, Jodessigsäure und Cyanide die glykolytischen Enzyme blockieren, was zur Senkung des zellulären ATP-Spiegels und zum Ausbleiben der Endozytosereaktionen führt (72). Eine Energieabhängigkeit muß aber angezweifelt werden, da bisher noch keine Energie verbrauchenden Prozesse, die während der Einstülpung ablaufen, identifiziert wurden. Ferner stützen sich die zitierten Ergebnisse auf den zellulären ATP-Gehalt und nicht auf den tatsächlichen ATP-Verbrauch. Da aber unter Voraussetzung dieser These ATP ständig regeneriert würde, können Messungen des ATP-Spiegels kein sicherer Maßstab für eine energieabhängige Endozytose sein (72). Die Aktivitäten der ATP-asen in der Ghostmembran sind verglichen mit anderen Enzymen wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase oder Acetylcholinesterase sehr gering, wobei die Ca^{2+} oder Mg^{2+} stimu-

lierbaren ATP-asen anteilmäßig noch am meisten vertreten sind. Eigene Versuche zeigten, daß geringe Mg^{2+} - Gegenwart (0,1mM) die Vesikulierbereitschaft eher verlangsamt, als beschleunigte. Hemmt man die Membran ATP-asen spezifisch mittels Oubain (g-Strophanthin) und gibt dieser Suspension Promethazin mit und ohne ATP/Mg^{2+} hinzu, so zeigt sich nur bei ATP-freiem Ansatz eine kontrollierte Vesikulierung (7). Dies beweist deutlich eine Energieunabhängigkeit der Endozytosereaktionen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch Katsumata (73), der den "energiereichen Zustand" der Vesikelbildung ebenfalls ohne ATP-Hydrolyse auslösen konnte. Dieser Autor mißt vielmehr der niedrigen Ionenstärke des Inkubationsmediums große Bedeutung bei und erklärt damit die Endozytose verlangsamende bzw. inhibierende Wirkung von bivalenten Kationen (Mg^{2+}).

Seeman (31) konnte energieabhängige Reaktionen ebenfalls nicht bestätigen. Dieser Autor vertritt (unabhängig von den Energiehypothesen) die Auffassung, daß viele Drogen, darunter Primaquine und Promethazin mit der Membran in Wechselwirkung treten und ihre Architektur beeinflussen. Den ersten Schritt dieser Wechselwirkung wird in einem Ansteigen des Membranvolumens ("expanding"), gesehen, als Folge eines sich Eingrabens des jeweiligen Moleküles in die Membran. Das Expandieren der Membran soll etwa den 10-fachen Betrag des van der Waal-Radius' des Moleküles ausmachen. Es hängt von einer Kombination mehrerer molekularer Mechanismen ab, u.a. vom Ordnungsgrad der Lipidphase vom Gehalt des Membranwassers und von der Änderung des Membran Ca^{2+} -Gehaltes. Mit der Wechselwirkung ist laut Seeman und nach den eigenen, hier beschriebenen, ebenfalls von Leutner (7) gefundenen Ergebnissen eine Änderung der Membranstabilität gegeben, die sich z.B. in Form einer Endozytose widerspiegeln kann. Eine Stabilisierung ist für die meisten Drogen nur in Bereichen unter $2 \times 10^{-2}M$ möglich, darüber tritt Membranzerfall ein. Abb. 19 zeigt ab 15 mg% ($5 \times 10^{-4}M$) eine kontrollierte, uneingeschränkte I.O.-Vesikulierung, was mit dem Abknicken der Sättigungskurve

übereinstimmt. Seeman (16) schlägt als Stabilisierungsmechanismus vor, daß sich die membranaktiven Drogen mit ihrem generell vorhandenen hydrophoben Anteilen über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Lipidphase verbinden, während der hydrophile Molekülschwanz über Ionenbindungen mit Phospholipiden interagiert. ESR-Studien an Erythrozytenghosts mit Chlorpromazine lassen eine Lokalisierung des Moleküles in der Interphase zwischen Phospholipiden und Proteinen vermuten (74).

Die These Seemans kann bestätigt werden; sie muß vielmehr in der Hinsicht ergänzt werden, als die scheinbar sehr schwache Ionenbindung im Zusammenspiel mit der hydrophoben Bindung das Promethazinmolekül sowohl fixiert, als auch die Endozytose erst in Gang setzt. Versuch 4.3.4. beweist, daß bei 0,04M NaCl-Zugabe zum Inkubationsmedium die I.O.-Vesikulierung nicht oder nur unvollkommen abläuft, da die zur Einleitung der Endozytose notwendigen Ladungsgruppen gestört sind. Da ionische Bindungen eine sehr große Reichweite besitzen, kann man annehmen, daß die Membran zunächst Moleküle einfängt, diese dann in Lipidschichten, die mit peripheren Proteinen in Wechselwirkung stehen, hydrophob bindet, und bestimmte Membranareale zur Invagination veranlaßt. Die Folge ist die beschriebene, kontrollierte, nicht spontan ablaufende Abschnürung nach Innen. Abb. 27,1 zeigt zunächst stark schematisiert die Einweisung des polaren, positiv geladenen Moleküles durch negative Membranladungen, wie z.B. Phospholipide. Glykolipide und Glykoproteine, insbesondere Neuraminsäure haltige, scheinen für den Beginn der Endozytosereaktion primär keinen Einfluß zu haben, da ihre voluminösen, aus der Membran herausragenden Seitenketten eher dazu beitragen, daß das Promethazinmolekül nicht an seinen Wirkungsort gelangen kann. Es liegt der Schluß nahe, daß polare Drogen (Promethazin, Vitamin A, Primaquine) mit Membranregionen in Wechselwirkung treten, deren Lipide frei zugänglich sind. Da das Membrangefüge, bedingt durch osmotische Verhältnisse (16 - 20 mOsm.) aufgelockert ist, "gräbt" sich das Molekül in hydrophobe Membranbereiche ein. Dort drängt das re-

relativ massive Ringgerüst des Promethazinmoleküles das Membrangefüge ähnlich einer Keilwirkung auseinander. Es kommt z.T. an mehreren Stellen zu einer lokalen Einstülpung, die dadurch beträchtlich verstärkt wird, daß sich der hydrophobe Ringkörper, Diffusionsgesetzen folgend, in tiefere Membranbereiche vorschieben möchte, seine hydrophile Seitenkette aber noch an den negativ geladenen Phospholipiden der Membranoberfläche fixiert ist (Abb. 27,2).

Vorstellbar ist ferner, daß sich erwähnte Membranregionen, die Promethazin in verstärktem Maße binden, gegenüber Membranbereichen, die keine Bindung eingehen, partial stärker positiv aufladen. Somit kann es innerhalb mehreren Abschnitten auf der Membranoberfläche zu einer Ladungstrennung und damit zu einer verstärkten Anziehung kommen, die in der erwähnten stabilisierten Endozytose gipfelt (Abb. 27,3). Alle genannten Punkte sind nur in einem gemeinsamen Zusammenspiel denkbar, wobei für eine morphologische Membranänderung die Ionenbindung die wichtigere zu sein scheint. Stört man nämlich die negativen Gruppen der Membran durch NaCl-Zusatz (4.3.4.), so läuft keine Endozytose ab. So ist es auch zu erklären, daß I.O.-Vesikulierung nicht eintreten kann, wenn offensichtliche Eingriffe in die Lipidstruktur der Membran mittels Phospholipase C vorgenommen werden (4.3.2.).

Daß auch das Strukturprotein Spektrin eine Rolle beim Stabilisierungs- und Endozytoseprozeß spielt, geht aus den Versuchen 4.3.2. und 4.3.3. hervor. Ohne Stabilisierung der Membran durch Promethazin zerfallen die Erythrozytenghosts nach einer Dialyse von 70 Stunden bei 0°C völlig unter fast quantitativer Abspaltung des Spektrin. Mit Promethazinzusatz ist unter diesen Bedingungen noch der größte Teil des Spektrin gebunden; die Erythrozytenghosts sehen morphologisch intakt aus, haben aber einen geringeren Durchmesser. Diese ghosts zeigen auch nach erneutem Promethazinzusatz keine Endozytosereaktion bei 37°C mehr. Wahr-

scheinlich können unter den Dialysebedingungen nicht genügend Promethazinmoleküle in die Membran eindringen, da das Spektrin, das mit den stabilisierten integralen Membranproteinen in Zusammenhang steht, diese aufeinander zuschiebt (ähnlich einem kontrahierenden Gummiband) und die Membran verdichtet. Dieser Zustand scheint irreversibel zu sein. Für die Absicherung dieser Hypothese fehlen aber noch weitere experimentelle Beweise.

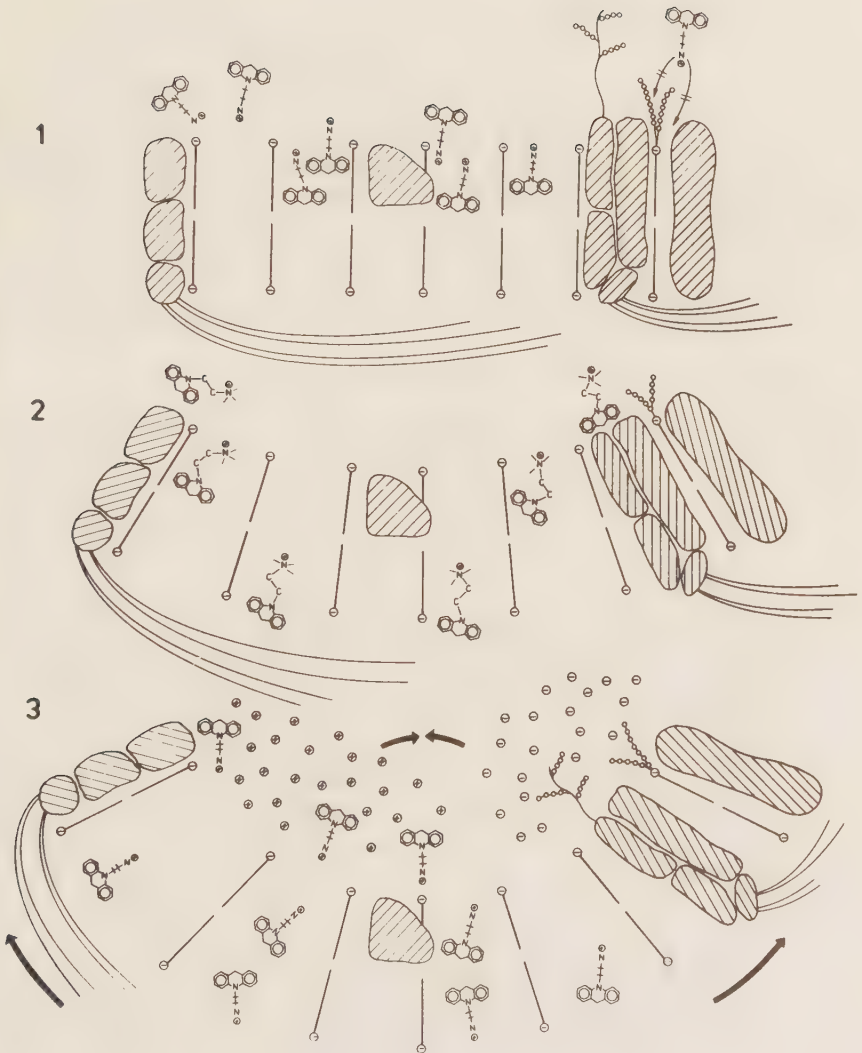


Abb. 27, 1-3: Schematische Darstellung der stabilisierten Endozytose mit Hilfe von polaren Agentien

6. Zusammenfassung

=====

1. Ghostmembranen von gewaschenen Humanerythrozyten O^+ können mittels Vitamin A, Primaquine oder Promethazin nach Innen gestülpt werden (Endozytose). Die Reaktion läuft gezielt an mehreren Stellen der Membran ab und ist nach ca. 45 - 60 Minuten beendet. Die einzelnen Stadien lassen sich im Phasenkontrastmikroskop verfolgen. I.O.-Vesikulierung ist im vorliegenden Phosphatpuffersystem, pH 7,6, temperaturabhängig. Sie läuft bei $37^{\circ}C$ uneingeschränkt ab, kann aber bei $0^{\circ}C$ unterbrochen werden.
2. Mit der Temperaturerhöhung auf $37^{\circ}C$ erlangen sowohl die Membranen der Ghoststandardsuspension, als auch die daraus durch Behandlung (Vesikulierung, Homogenisierung) entstehenden I.O.- und R.O.-Partikel z.T. ihre Semipermeabilität gegenüber bestimmten Molekülen zurück und können auf einem 3,14%igen Dextrankissen in 2 Fraktionen getrennt werden. In der oberen Bande befinden sich Membranen, die für Dextran dicht sind. Die Membranen in der unteren Bande sind "offen". Die Trennleistung des Dextrankissens nach dem Kriterium "offene-geschlossene" Membranvesikel kann dadurch getestet werden, daß ^{14}C -Saccharose bei der Darstellung der Membranvesikel in diese eingesiegelt wird. Die Vesikel auf dem Dextrankissen zeigen hohe ^{14}C -Aktivität, die Vesikel in der unteren Bande (offene Vesikel) zeigen sehr geringe Aktivitäten. Ein 31,7%-iges Saccharosekissen zeigt gleiches Trennergebnis. Die Versuche sind allerdings schlecht zu reproduzieren, da leichte Schmiereffekte zwischen den Banden auftreten. Somit müssen die beschriebenen Ghostmembranen im hypotonischen Phosphatpuffer zumindest für Moleküle $\gg$ Saccharose "dicht" sein.
3. Das Proteinmuster des Materials beider Banden ist identisch,

wohingegen das Lipid-Protein Verhältnis leicht zur unteren Bande hin verschoben ist. Diese Tatsache spricht gegen eine Trennung nach Dichteunterschieden.

4. Für die Auftrennung beider Populationen (I.O.-R.O.) sind allein die unterschiedlichen Oberflächenladungen, bedingt durch unterschiedliche Orientierung der Neuraminsäure heranzuziehen. Demzufolge können beide Vesikelpopulationen mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese voneinander getrennt werden.
5. Das bei der Endozytosereaktion mitbeteiligte Promethazinmolekül kann durch Oxidation mittels FeCl_3 im schwefelsauren Milieu quantitativ nachgewiesen werden. Da hydrophobe Wechselwirkungen des Promethazins mit der Membran wahrscheinlich sind, muß mit chaotropen Reagentien extrahiert werden, damit die Reaktion quantitativ abläuft.
6. Bei der Endozytosereaktion muß eine einfache Adsorption oder ein Einschluß des Promethazinmoleküles an oder in die Ghostmembran und deren Vesikel ausgeschlossen werden, da es sowohl in "geschlossene" als auch in "offene" Membranen nach Wasch- und Dialysebehandlung nachgewiesen werden kann. Der spezifische Promethazingehalt ist außerdem in den elektrophoretischen abgetrennten I.O.-Vesikeln ca. 6 Mal höher als in den R.O.-Vesikeln. Dies bedeutet, daß es auf der Erythrozytenmembran mehrere Areale mit bevorzugten Bindungsstellen für das Promethazinmolekül gibt, die sich nach der Bindung endozytotisch einstülpen. Ein Beweis hierfür ist auch das Ausbleiben einer erneuten Endozytose bei elektrophoretisch getrennten R.O.-Partikel bei erneutem Promethazinzusatz. Für Promethazin können 2 unterschiedliche Bindungsarten mit der Erythrozytenmembran festgestellt werden: Eine lockere und eine sehr feste (hydrophobe). Es muß allerdings auf eine

die Endozytose unterstützende Wirkung des Puffermilieus (16 - 20 mOsm.) hingewiesen werden. Unter isoionen bzw. isotonen Bedingungen ist keine I.O.-Vesikulierung mit Promethazin möglich.

7. Eine Stabilisierung der Ghostmembran durch die polare Droge Promethazin ist offensichtlich. Die Gründe dafür müssen in den peripheren Proteinen, vornehmlich dem Spektrin, gesehen werden. Dialysiert man Ghostmembranen gegen Lösungen geringer Ionenstärke, so findet starke Spektrinextraktion statt unter Bildung von Vesikeln und Membranbruchstücken. Dies tritt nicht ein, wenn der niederionischen Lösung (< 15 mOsm.) Promethazin hinzugefügt wird. Es wird nur sehr wenig extrahiertes Spektrin gefunden. Die Membranen sind dann morphologisch auch nach 70-stündiger Dialyse kaum verändert.
8. Die beschriebene Membranstabilisierung steht im Zusammenhang mit der Endozytosereaktion. Die I.O.-Vesikulierung läuft nur mit Promethazin (bei 16 - 20 mOsm.) kontrolliert ab. I.O.- und R.O.-Partikel zeigen das gleiche Proteinmuster, d.h. I.O.-Vesikelbildung kann nicht durch Spektrinverlust bedingt sein. Man muß von einer durch polare Drogen stabilisierten, kontrollierten Endozytose sprechen, die durch hypotones Puffermilieu (16 - 20 mOsm.) unterstützt wird.
9. Der Einstülpungsmechanismus nach Innen durch polare Drogen muß durch eine Membranexpandierung eingeleitet werden: Das Promethazinmolekül gräbt sich mit seinem lipophilen Anteil in die Lipidregion ein (hydrophobe Wechselwirkung), während das hydrophile Schwanzende durch Ionenbindung mit negativen Gruppen (z.B. Phospholipide) fixiert wird. Beide Prozesse sind für die Endozytosereaktion nur in einem zusammenhängenden Ablauf ("konzertierte Aktion") denkbar: Stört man die

Ausbildung einer Ionenbindung durch NaCl-Zusatz, so findet keine Einstülpung statt.

10. I.O.-Vesikulierung kann folglich nur als ein lipidabhängiges Ereignis angesehen werden, das unmittelbar mit Strukturproteinen (z.B. Spektrin) verknüpft ist.

Literaturverzeichnis

=====

1. Harrison, R., Lunt, G.G., "Biologische Membranen",
Verlag Gustav Fischer, Stuttgart-New York (1977).
2. Segrest, I.P., Kahane, J., Jackson, R.L., Marchesi, V.T.,
Arch.Biochem.Biophys., 155 (1973) pp. 167-183.
3. Singer, S.J., Ann. Rev. Biochem. 43, (1974) pp. 805 - 833.
4. Sheetz, M.P., Paniter, R.G., Singer, S.J., in Cell Mobility,
(1976), Book, B., Goldman, R., Pollard, T., Rosenbaum, J.,
Ed., Cold Spring Harbour, N.Y., Cold Spring Harbour Labora-
tory, pp. 651 - 674.
5. Heidrich, H.-G., Leutner, G., Europ.J.Biochem., 41 (1974)
pp. 37 - 43.
6. Hannig, K., Heidrich, H.-G., Methods of Enzymology XXI,
Editors: Fleischer, S. and Packer, L., Academic Press,
New York, San Francisco, London (1974) pp. 746.
7. Leutner, G., Dissertation, München 1975.
8. Steck, T.L., Weinstein, R.S., Straus, J.H., Wallach, D.F.H.,
Science, 168 (1970) pp. 255 - 257.
9. Bodemann, H., Passow, H., J. Memb. Biol., 8 (1972) pp. 1 - 26.
10. Johnson, R.M., J. Memb. Biol., 22 (1975) pp. 231 - 253.
11. Billah, M.M., Finean, J.B., Coleman, R., Michell, R.H.,
Biochim. Biophys. Acta., 433 (1976) pp. 54 - 62.
12. Penniston, J.T., Green, D.E., Arch.Biochem.Biophys., 128
(1968) pp. 339-350.

13. Glauert, A.M., Daniel, M.R., Lucy, J.A., Dingle, J.T.,
J. Cell Biol., 17 (1963) pp. 111 - 121.
14. Dingle, J.T., Lucy, J.A., Biochem. J., 84 (1962) pp. 611-621.
15. Ginn, F.L., Hochstein, P., Trump, B.F., Science, 164 (1969)
pp. 843 - 845.
16. Seeman, Ph., "Membrane Stabilization and Expansion by Drugs",
pp. 384 - 391 aus "Stoffwechsel und Membranpermeabilität von
Erythrozyten und Trombozyten" von Deutsch, E., Gerlach, E.,
Moser, K., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968).
17. Hannig, K., Habilitationsschrift, München 1964.
18. Maurer, H.R., "Disk-Elektrophorese", Verlag Walter de
Gruyter & Co., Berlin (1968).
19. Laemmli, U.K., Nature (Lond.), 227 (1970) pp. 680 - 685.
20. Weber, K., Osborn, M., J. Biol.Chem., 244 (1969) pp. 4406-4412.
21. Wallach, D.F.H., Knüfermann, H.G., "Plasmamembranen", Springer-
Verlag, New York, Heidelberg (1973) pp. 58 - 64.
22. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H., Biochem.10,
No. 13 (1971) pp. 2606 - 2617.
23. Jarrett, H.W., Penniston, J.T., Biochim. Biophys. Acta,
448 (1976) pp. 314 - 324.
24. Low, M.G., Limbrick, A.R., Finean, J.B., FEBS Lett., 34
(1973) pp. 1 - 4.
25. Coleman, R., Finean, J.B., Knitton, S., Limbrick, A.R.,
Biochim.Biophys. Acta 219, (1970) pp. 81 - 92.

26. Nicolson, G.L., Biochim. Biophys. Acta 457 (1976) pp. 57-108.
27. Ralston, G.B., Biochim. Biophys. Acta 401 (1975) pp. 83 - 94.
28. Ralston, G.B., Biochim. Biophys. Acta 443 (1976) pp. 387-393.
29. Seeman, P., Pharmacol. Reviews, 24, No.4 (1972) pp. 583 - 655.
30. Roth, S., Seeman, P., Nature, 231 (1971) pp. 284 - 285.
31. Seeman, P., Biochem. Pharmacol, 15 (1966) pp. 1753 - 1766.
32. Zimmermann, U., Riemann, F., Pilwat, G., Biochim. Biophys. Acta, 436 (1976) pp. 460 - 474.
33. Billah, M.M., Finean, J.B., Coleman, R., Michell, R.H., Biochim. Biophys. Acta, 465 (1977) pp. 515 - 526.
34. Heidrich, H.-G., Hannig, K., Adv. in Automated Analysis (1970) pp. 347 - 350.
35. Krieglstein, J., Kuschinsky, G., Arzneim.-Forschung, 18 (1968) pp. 287-289.
36. Glasser, H., Krieglstein, J., Naunyn-Schmiedeberg's, Arch. Pharmak., 265. (1970) pp. 321 - 334.
37. Steck, T.L., Straus, J.H., Wallach, D.F.H., Biochim. Biophys. Acta, 203 (1970) pp. 385 - 393.
38. Francesco, C., Bickel, M.H., Chem.-Biol.Interactions, 16 (1977) pp. 335 - 346.
39. Lee, A.G., Biochim. Biophys. Acta 448, (1976) pp. 34 - 44.

40. Buchler, Amersham, Technisches Bulletin 74/4, Februar 1975.
41. Meshi, T., Takahasi, T., Bulletin of the Chemical Society of Japan, 35 (1962) pp. 1501 - 1504.
42. Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967) pp. 483 - 491.
43. Luft, J.H., J. Biophys. Biochem., Cytology, 9 (1961) pp.409-414.
44. Fischer, H.A., Werner, G., Naturwissenschaften, 60 (1973), Heft 1, pp. 47 - 48.
45. Fischer, H.A., Korr, H., Thiele, H., Werner, G., Naturwissenschaften, 58 (1971), Heft 2, pp. 101 - 102.
46. Fischer, H.A., Korr, H., Werner, G., Naturwissenschaften, 57 (1970), Heft 9, pp. 450 - 451.
47. Caro, L.G., Tubergen, R.P.van, J. Cell. Biol., 15 (1962) pp. 173 - 188.
48. Fischer, H.A., Werner, G., Histochemie, 29 (1972) pp. 44 - 53.
49. Bachmann, L., Salpeter, M.M., Elektronenmikroskopische Autoradiographie in Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Herausgeber G.Schimmel, W.Vogell, Wiss.Verlag.Ges. Stuttg.1973.
50. Weed, R.J., Chailley, B., Nouvelle Revue Francaise d' Hematologie, 12 (1972) pp. 775 - 788.
51. Heidrich, H.-G., persönl.Mitteilung.
52. Michaelis, L., Schubert, M.P., Gramick, J., Amer.Chem.Soc., 62 (1940) p. 204.

53. Důsinsky, G., Arzneipflanzen-Umschau, 8, (1958) pp. 478-480.
54. Marchesi, S.L., Steers, E., Marchesi, V.T., Tillack, T.W., Biochemistry, 9, (1970) pp. 50-57.
55. Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, (1949) pp. 660-672.
56. Bickel, M.H., Steele J.W., Chem.-Biol. Interactions, 8 (1974) pp. 151-162.
57. Schwoch, G., Passow, H., Mol. Cell. Biochem., 2, No.2, (1973) pp. 197-218.
58. Shaklai, N., Yguerabiole, J., Ranney, H.M., Biochem., 16 No.25 (1977) pp. 5593-5597.
59. Dodge, J.T., Mitchell, C.D., Hanahan, D.J., Arch. Biochem. Biophys., 100 (1963) pp. 119-130.
60. Teorell, T., Journal Gen. Physiol., 35 (1952) pp. 669-701.
61. Hoffmann, J.F., Tosteson, D.C., Whittam, R., Nature, 185 (1960) pp. 186-187.
62. Marchesi, V.T., Furthmayr, H., Ann. Rev. Biochem., 45 (1976) pp. 667-698.
63. Aloni, B., Livne, A., Biochim. Biophys. Acta, 339 (1974) pp. 359-366.
64. Walter, H., Krob, J.E., Biochim. Biophys. Acta, 445 (1976) pp. 8-23.
65. Elferink, J.G.R., Biochem. Pharmac., 26 (1977) pp. 2411-2416.
66. Lutz, H.U., Chimia, 29, No.12 (1975) p. 532.
67. Allen, J.E., Rosmussen, H., Science, 174 (1971) pp. 512-514.

68. Evans, E.A., Biophys. J., 13 (1973) pp. 926-940.
69. Elgsaeter, A., Shotton, D.M., Branton, D., Biochim. Biophys. Acta, 426 (1976) pp. 101-122.
70. Hayashi, H., Penniston, J.T., Arch. Biochem. Biophys., 159 (1973) pp. 563-569.
71. Schrier, S.L., Seeger, M., Junga, J., Bensch, K., Blood, 42 No. 6 (1973) p. 981.
72. Silverstein, S.C., Steinmann, R.M., Cohn, Z.A., Ann. Rev. Biochem., 46 (1977) pp. 669-772.
73. Katsumata, Y., Asai, J., Arch. Biochem. Biophys., 150 (1972) pp. 330-332.
74. Leterrier, F., Mendyk, A., Viret, J., Biochem. Pharmacol., 25 (1976) pp. 2469-2474.

Lebenslauf

Am 12. April 1949 wurde ich, Ulrich Vogel, als Sohn des Ingenieurs Hilmar Vogel und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Dreißig, in Friedberg/Hessen geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bad Homburg v.d.H. (1956 - 1960) trat ich in das dortige Kaiserin-Friedrich-Gymnasium ein. Bedingt durch Versetzung meines Vaters nach Bayern, wechselte ich 1962 in die Oberrealschule Dachau über. 1966 trat ich in das Max-Planck-Gymnasium München-Pasing ein, wo ich im Juni 1969 das Abitur bestand.

Im Herbst 1969 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Lebensmittelchemie, das ich im Dezember 1973 mit dem Staatsexamen Teil A abschloß. Nach einer einjährigen Praktikantenausbildung am Staatlichen Untersuchungsamt Augsburg und München, legte ich im Februar 1975 das Staatsexamen Teil B ab.

Von März 1975 bis März 1978 arbeitete ich experimentell am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried an vorliegender Dissertation.

